

(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 02/18632 A2

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68** (81) Bestimmungsstaaten (national): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP01/10074

(22) Internationales Anmelde datum:
1. September 2001 (01.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 43 826.1 1. September 2000 (01.09.2000) DE
100 44 543.8 5. September 2000 (05.09.2000) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): OLEK, Alexander [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE). PIEPENBROCK, Christian [DE/DE]; Schwartzkopffstrasse 7 B, 10115 Berlin (DE). BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE). GÜTIG, David [DE/DE]; Kastanienallee 74, 10435 Berlin (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5, 10178 Berlin-Mitte (DE).

(84) Bestimmungsstaaten (regional): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Veröffentlicht:

— ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts

— mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

Zur Erklärung der Zweibuchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

(54) Title: METHOD FOR DETERMINING THE DEGREE OF METHYLATION OF DEFINED CYTOSINES IN GENOMIC DNA IN THE SEQUENCE CONTEXT 5'-CPG-3'

(54) Bezeichnung: VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES METHYLIERUNGSGRADES VON BESTIMMTEN CYTOSINEN IN GENOMISCHER DNA IM SEQUENZKONTEXT 5'-CPG-3'

(57) Abstract: The invention relates to a method for detecting the degree of methylation of a defined cytosine in the sequence context 5'-CpG-3 of a genomic DNA sample. The first stage involves chemically treating the genomic DNA in such a way that the cytosine bases, but not the 5-methylcytosine bases, are converted into uracil. Parts of the genomic DNA containing the defined cytosine are then amplified. The amplified parts are given a detectable mark and the extent of the hybridisation of the amplified parts on the two classes of oligonucleotides is then determined by detecting the mark of the amplified parts. The degree of methylation of the defined cytosine in the genomic DNA sample can be deduced on the basis of the relationship between the marks detected on the two classes of oligonucleotides following the hybridisation.

(57) Zusammenfassung: Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3 einer genomischen DNA-Probe. Im ersten Schritt wird die genomische DNA chemisch behandelt, dass die Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, nicht aber die 5-Methylcytosinbasen. Anschließend werden Teile der genomischen DNA amplifiziert, die das besagte bestimmte Cytosin enthalten, wobei die Amplifikate eine nachweisbare Markierung erhalten und in den folgenden Schritten wird das Ausmaß der Hybridisierung der Amplifikate an die zwei Klassen von Oligonukleotiden durch Detektion der Markierung der Amplifikate bestimmt und aus dem Verhältnis der an den zwei Klassen von Oligonukleotiden in Folge der Hybridisierung detektierten Markierungen auf den Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA-Probe geschlossen.

WO 02/18632 A2

**Verfahren zur Bestimmung des Methylierungsgrades
von bestimmten Cytosinen in genomischer DNA
im Sequenzkontext 5'-CpG-3'**

5

Die Erfindung betrifft ein Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3' einer genomischen DNA-Probe.

10 Die nach den methodischen Entwicklungen der letzten Jahre in der Molekularbiologie gut studierten Beobachtungsebenen sind die Gene selbst, die Übersetzung dieser Gene in RNA und die daraus entstehenden Proteine. Wann im Laufe der Entwicklung eines Individuums welches

15 Gen angeschaltet wird und wie Aktivieren und Inhibieren bestimmter Gene in bestimmten Zellen und Geweben gesteuert wird, ist mit Ausmaß und Charakter der Methylierung der Gene bzw. des Genoms korrelierbar. Insofern äußern sich pathogene Zustände in einem

20 veränderten Methylierungsmuster einzelner Gene oder des Genoms.

Die vorliegende Erfindung beschreibt ein Verfahren, mit dem viele Cytosinbasen in einer gegebenen DNA-Probe gleichzeitig auf das Vorliegen einer Methylgruppe an der Position 5 mittels Hybridisierung untersucht werden können. Sie beschreibt weiterhin Nukleinsäuren, Oligonukleotide und PNA-Oligomere welche nützlich sind um das Verfahren zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen

30 oder der Prädisposition für Erkrankungen einzusetzen.

5-Methylcytosin ist die häufigste kovalent modifizierte Base in der DNA eukaryotischer Zellen. Sie spielt beispielsweise eine Rolle in der Regulation der

35 Transkription, beim genetischen Imprinting und in der

Tumorgenese. Die Identifizierung von 5-Methylcytosin als Bestandteil genetischer Information ist daher von erheblichem Interesse. 5-Methylcytosin-Positionen können jedoch nicht durch Sequenzierung identifiziert werden, da

5 5-Methylcytosin das gleiche Basenpaarungsverhalten aufweist wie Cytosin. Darüber hinaus geht bei einer PCR-Amplifikation die epigenetische Information, welche die 5-Methylcytosine tragen, vollständig verloren.

10 Die Methylierung von CpG Inseln wird oft mit Transkriptionsinaktivität gleichgesetzt. Obwohl es eindeutige Beweise dafür gibt, dass die CpG Inseln in den Promotoren der Gene zu finden sind, sind nicht alle CpG Inseln und Methylierungsstellen in bekannten Promotoren

15 lokalisiert. Bei verschiedenen gewebsspezifischen und „imprinting“ Genen sind die CpG Inseln in beträchtlichen Entfernungen stromabwärts des Transkriptionsstarts lokalisiert, zusätzlich besitzen viele Gene multiple Promotoren. Für eine Vielzahl von Erkrankungen wurde

20 Methylierung von CpG Dinukleotiden als ursächlich nachgewiesen. Im Gegensatz zu klassischen Mutationen, handelt es sich bei der DNA-Methylierung um einen Mechanismus, der eine Basensubstitution beschreibt, ohne die codierende Funktion eines Gens zu verändern. Dieses

25 Wechselspiel zwischen epigenetischer Modifikation und klassischen Mutationen spielt eine wichtige Rolle in der Tumorgenese. Beispielsweise sind fokale Hypermethylierung und generalisierte genomische Demethylierung Merkmale vieler verschiedener Tumortypen. Es wird angenommen, dass

30 die Tumorgenese und die Tumorprogression zum einen durch Hypermethylierung induzierter Mutationereignisse und zum anderen durch das Abschalten von Genen, welche die zelluläre Proliferation und/oder die induzierte Reaktivierung von Genen über Demethylierung

35 kontrollieren, die nur für die embryologische Entwicklung gebraucht werden, verursacht werden.

Bei dem vererbaren non-polyposis Colorektalkrebs beruht z. B. der Hauptteil der mutationsnegativen Dickdarmkrebs Fälle eher auf der Hypermethylierung des hMLH1 Promotors und der anschließenden Nicht-Expression von hMLH1, ein Reparaturgen für Fehlpaarungen (Bevilacqua RA, Simpson AJ. Methylation of the hMLH1 promoter but no hMLH1 mutations in sporadic gastric carcinomas with high-level microsatellite instability. *Int J Cancer.* 2000 Jul 10 15;87(2):200-3.). Bei der Pathogenese von Lungenkrebs ist der Verlust der Expression mit der Methylierung von CpG Inseln in der Promotor Sequenz eines RAS Effektor-Homologs korreliert. (Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP, Nucleotide. Epigenetic inactivation 15 of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus3p21.3. *Nat Genet.* 2000 Jul;25(3):315-9). Eine epigenetische Inaktivierung des LKB1 Tumorsuppressorgens, welche die Hypermethylierung des Promotors mit einschließt, ist mit dem Peutz-Jeghers Syndrom assoziiert (Esteller M, Avizienyte E, Corn PG, Lothe RA, Baylin SB, Aaltonen LA, Herman JG, Epigenetic 20 inactivation of LKB1 in primary tumors associated with the Peutz-Jeghers syndrome. *Oncogene.* 2000 Jan 6;19(1):164-8),

25 Eine Vielzahl von Erkrankungen, die mit Methylierung assoziiert sind, weisen in ihrer Ätiologie eine enge Verbindung zu den Tumorsuppressorgenen p16 oder p15 Gene auf. So wird eine Beziehung zwischen Mycoso fungoides und der Hypermethylierung des p16(INK4a) Gens angenommen 30 (Navas IC, Ortiz-Romero PL, Villuendas R, Martinez P, Garcia C, Gomez E, Rodriguez JL, Garcia D, Vanaclocha F, Iglesias L, Piris MA, Algara P, p16(INK4a) gene alterations are frequent in lesions of mycosis fungoides. *Am J Pathol.* 2000 May; 156(5):1565-72). Auch wird von

einer starken Korrelation zwischen dem Abschalten der Transkription des p16 Gens bei dem gastrischen Karzinom und der de novo Methylierung einiger weniger spezifischer CpG Stellen ausgegangen (Song SH, Jong HS, Choi HH, Kang 5 SH, Ryu MH, Kim NK, Kim WH, Bang YJ, Methylation of specific CpG sites in the promoter region could significantly down-regulate p16(INK4a) expression in gastric adenocarcinoma. Int J Cancer. 2000 Jul 15;87(2):236-40). Die Pathogenese des Cholangiokarzinoms, 10 welches mit der primär sklerosierenden Cholangitis assoziiert ist, wird mit der Inaktivierung des p16 Tumorsuppressorgens, welches wiederum von der Methylierung des p16 Promotors abhängig ist, in Zusammenhang gebracht (Ahrendt SA, Eisenberger CF, Yip L, Rashid A, Chow JT, 15 Pitt HA, Sidransky D, Chromosome 9p21 loss and p16 inactivation in primary sclerosing cholangitis-associated cholangiocarcinoma. J Surg Res. 1999 Jun 1;84(1):88-93). Bei der Leukämogenese und beim Fortschreiten der akuten 20 lymphatischen Leukämie spielt die Inaktivierung des p16 Gens durch Hypermethylierung eine Rolle (Nakamura M, Sugita K, Inukai T, Goi K, Iijima K, Tezuka T, Kojika S, Shiraishi K, Miyamoto N, Karakida N, Kagami K, O-Koyama T, Mori T, Nakazawa S, p16/MTS1/INK4A gene is frequently inactivated by hypermethylation in childhood acute 25 lymphoblastic leukemia with 11q23 translocation. Leukemia. 1999 Jun;13(6):884-90). Weiterhin wird postuliert, dass die Hypermethylierung der p16 und p15 Gene eine entscheidende Rolle bei der Tumogenese des multiplen Myeloms spielt (Ng MH, Wong IH, Lo KW, DNA 30 methylation changes and multiple myeloma. Leuk Lymphoma. 1999 Aug;34(5-6):463-72). An der Prädisposition des Nierenkarzinoms scheint das durch Methylierung

inaktivierte VHL-Gen beteiligt zu sein (Glavac D, Ravnik-Glavac M, Ovcak Z, Masera A, Genetic changes in the origin and development of renal cell carcinoma (RCC). Pflugers Arch. 1996;431(6 Suppl 2):R193-4). Eine 5 abweichende Methylierung der 5' CpG Insel ist möglicherweise an der Transkriptionsinaktivierung des p16 Gens bei dem nasopharyngealen Karzinom beteiligt (Lo KW, Cheung ST, Leung SF, van Hasselt A, Tsang YS, Mak KF, Chung YF, Woo JK, Lee JC, Huang DP, Hypermethylation of 10 the p16 gene in nasopharyngeal carcinoma. Cancer Res. 1996 Jun 15;56(12):2721-5). Bei dem Leberzellenkarzinom wurde eine Inaktivierung des p16 Proteins nachgewiesen. Promotor Hypermethylierung und homozygote Deletionen gehören hier zu den häufigen Mechanismen (Jin M, Piao Z, 15 Kim NG, Park C, Shin EC, Park JH, Jung HJ, Kim CG, Kim H, p16 is a major inactivation target in hepatocellular carcinoma. Cancer. 2000 Jul 1;89(1):60-8). DNA-Methylierung als Kontrolle der Genexpression wurde für das BRCA1 Gen für Brustkrebs nachgewiesen (Magdinier F, 20 Billard LM, Wittmann G, Frappart L, Benchaib M, Lenoir GM, Guerin JF, Dante R Regional methylation of the 5' end CpG island of BRCA1 is associated with reduced gene expression in human somatic cells FASEB J. 2000 Aug;14(11):1585-94). Eine Korrelation zwischen 25 Methylierung und Non-Hodgkin's Lymphom wird ebenfalls angenommen (Martinez-Delgado B, Richart A, Garcia MJ, Robledo M, Osorio A, Cebrian A, Rivas C, Benitez J, Hypermethylation of P16ink4a and P15ink4b genes as a marker of disease in the follow-up of non-Hodgkin's 30 lymphomas. Br J Haematol. 2000 Apr;109(1):97-103).

CpG-Methylierung ruft auch das Fortschreiten der T-Zell Leukämie hervor, die in Zusammenhang mit der verminderten Expression des CDKN2A Gens steht (Nosaka K, Maeda M, Tamiya S, Sakai T, Mitsuya H, Matsuoka M, Increasing 5 methylation of the CDKN2A gene is associated with the progression of adult T-cell leukemia. Cancer Res. 2000 Feb 15;60(4):1043-8). Bei Blasenkrebs wurde eine erhöhte Methylierung der CpG-Inseln festgestellt (Salem C, Liang G, Tsai YC, Coulter J, Knowles MA, Feng AC, Groshen S, 10 Nichols PW, Jones PA, Progressive increases in de novo methylation of CpG islands in bladder cancer. Cancer Res. 2000 May 1;60(9):2473-6). Die Transkriptionsinaktivierung von Plattenepithelkarzinomen der Speiseröhre wird in Verbindung mit der Methylierung des FHIT Gens gebracht, 15 das mit dem Fortschreiten der Erkrankung assoziiert ist (Shimada Y, Sato F, Watanabe G, Yamasaki S, Kato M, Maeda M, Imamura M, Loss of fragile histidine triad gene expression is associated with progression of esophageal squamous cell carcinoma, but not with the patient's 20 prognosis and smoking history. Cancer. 2000 Jul 1;89(1):5-11). Die Neutral Endopeptidase 24.11 (NEP) inaktiviert das Wachstum von Neuropeptiden, die an dem Wachstum des Androgen unabhängigen Prostatakrebs 25 beteiligt sind. Ein Verlust der NEP Expression durch Hypermethylierung des NEP-Promotors trägt möglicherweise zu der Entwicklung des Neuropeptid stimulierten Androgen unabhängigen Prostatakrebses bei (Usmani BA, Shen R, Janeczko M, Papandreou CN, Lee WH, Nelson WG, Nelson JB, Nanus DM, Methylation of the neutral endopeptidase gene 30 promoter in human prostate cancers. Clin Cancer Res. 2000 May;6(5):1664-70). Der adrenokortikale Tumor bei Erwachsenen weist strukturelle Abnormalitäten bei Tumor-

DNA auf. Diese Abnormalitäten beinhalten unter anderem eine Überexpression des IGF2 Gens in Korrelation mit einer Demethylierung der DNA an diesem Locus (Wilkin F, Gagne N, Paquette J, Oigny LL, Deal C, *Pediatric adrenocortical tumors: molecular events leading to insulin-like growth factor II gene overexpression.* J Clin Endocrinol Metab. 2000 May;85(5):2048-56. Review). Es wird angenommen, dass bei dem Retinoblastomgen DNA-Methylierungen in mehreren Exons an der Erkrankung beteiligt sind (Mancini D, Singh S, Ainsworth P, Rodenhiser D, *Constitutively methylated CpG dinucleotides as mutation hot spots in the retinoblastoma gene (RB1).* Am J Hum Genet. 1997 Jul;61(1):80-7). Bei chronischer myeloischer Leukämie wird ein Zusammenhang zwischen der Deregulation des p53 Gens und einer Veränderung des Methylierungsmusters mit der Progression der Erkrankung vermutet (Guinn BA, Mills KI, *p53 mutations, methylation and genomic instability in the progression of chronic myeloid leukaemia.* Leuk Lymphoma. 1997 Jul;26(3-4):211-26). Auch für die akute myeloische Leukämie wurde ein Zusammenhang mit Methylierung nachgewiesen (Melki JR, Vincent PC, Clark SJ. *Concurrent DNA hypermethylation of multiple genes in acute myeloid leukemia.* Cancer Res. 1999 Aug 1;59(15):3730-40). Es wurde eine tumorspezifische Methylierungsstelle in dem Supressorgen für den Wilms Tumor identifiziert (Kleymenova EV, Yuan X, LaBate ME, Walker CL, *Identification of a tumor-specific methylation site in the Wilms tumor suppressor gene.* Oncogene. 1998 Feb 12;16(6):713-20). Bei dem Burkitt Lymphom weisen einige Promotoren eine vollständige CpG-Methylierung auf (Tao Q, Robertson KD, Manns A, Hildesheim A, Ambinder RF, *Epstein-Barr virus (EBV) in*

endemic Burkitt's lymphoma: molecular analysis of primary tumor tissue. Blood. 1998 Feb 15;91(4):1373-81). Es wird angenommen, dass bei dem Schilddrüsenkarzinom die DNA-Methylierung eine Rolle spielt (Venkataraman GM, Yatin M,

5 Marcinek R, Ain KB, Restoration of iodide uptake in dedifferentiated thyroid carcinoma: relationship to human Na⁺/I-symporter gene methylation status. J Clin Endocrinol Metab. 1999 Jul;84(7):2449-57).

10 Nicht nur viele Krebserkrankungen sind mit Methylierung assoziiert, auch viele nicht Krebserkrankungen werden mit Methylierung in Zusammenhang gebracht. So weisen Untersuchungen zur entzündlichen Arthritis darauf hin, dass diese Erkrankung mit einer Untermethylierung

15 genomischer DNA assoziiert ist (Kim YI, Logan JW, Mason JB, Roubenoff R, DNA hypomethylation in inflammatory arthritis: reversal with methotrexate. J Lab Clin Med. 1996 Aug;128(2):165-72). Für das ICF-Syndrom wurde eine Methylierungs regulierte Expression nachgewiesen (Kondo T, Bobek MP, Kuick R, Lamb B, Zhu X, Narayan A, Bourc'his D, Viegas-Pequignot E, Ehrlich M, Hanash SM, Whole-genome methylation scan in ICF syndrome: hypomethylation of non-satellite DNA repeats D4Z4 and NBL2). Die Beteiligung von Methylierung an systemischem Lupus erythematosus wird

20 vermutet (Vallin H, Perers A, Alm GV, Ronnblom L, Anti-double-stranded DNA antibodies and immunostimulatory plasmid DNA in combination mimic the endogenous IFN-alpha inducer in systemic lupus erythematosus. J Immunol. 1999 Dec;163(11):6306-13); ebenso ein Zusammenhang zwischen

25 der Muskeldystrophy Duchenne und einer CpG reichen Insel -(Banerjee S, Singh PB, Rasberry E, Cattanach BM, Embryonic inheritance of the chromatin organisation of

30

the imprinted H19 domain in mouse spermatozoa. *Mech Dev.* 2000 Feb;90(2):217-26; Burmeister M, Lehrach H, Long-range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature.* 1986 Dec 11-17;324(6097):582-5).

5 Ein epigenetischer Effekt, der an der Untermethylierung des Amyloid Precursor Proteins, beteiligt ist, welches mit der Ausbildung der Erkrankung in Zusammenhang steht, wird bei der Alzheimer Erkrankung vermutet (West RL, Lee JM, Maroun LE, Hypomethylation of the amyloid precursor protein gene in the brain of an Alzheimer's disease patient. *J Mol Neurosci.* 1995;6(2):141-6). Auch auf chromosomaler Ebene spielt der Methylierungsstatus eine wichtige Rolle. Beispielsweise wird bei mentalen Retardierungssyndromen, die mit der Fragilität des X-
10 15 Chromosoms gekoppelt sind, der Grad der Chromosomenbrüchigkeit durch die Methylierung bestimmt (de Muniaín AL, Cobo AM, Poza JJ, Saenz A, [Diseases due to instability of DNA]. *Neurologia.* 1995 Dec;10 Suppl 1:12-9).

20 Eine relativ neue und die mittlerweile am häufigsten angewandte Methode zur Untersuchung von DNA auf 5-Methylcytosin beruht auf der spezifischen Reaktion von Bisulfit mit Cytosin, das nach anschließender alkalischer 25 Hydrolyse in Uracil umgewandelt wird, welches in seinem Basenpaarungsverhalten dem Thymidin entspricht. 5-Methylcytosin wird dagegen unter diesen Bedingungen nicht modifiziert. Damit wird die ursprüngliche DNA so umgewandelt, dass Methylcytosin, welches ursprünglich 30 durch sein Hybridisierungsverhalten vom Cytosin nicht unterschieden werden kann, jetzt durch „normale“ molekularbiologische Techniken als einzig verbliebenes Cytosin beispielsweise durch Amplifikation und

Hybridisierung oder Sequenzierung nachgewiesen werden kann. Alle diese Techniken beruhen auf Basenpaarung, welche jetzt voll ausgenutzt wird. Der Stand der Technik, was die Empfindlichkeit betrifft, wird durch ein

5 Verfahren definiert, welches die zu untersuchende DNA in einer Agarose-Matrix einschließt, dadurch die Diffusion und Renaturierung der DNA (Bisulfit reagiert nur an einzelsträngiger DNA) verhindert und alle Fällungs- und Reinigungsschritte durch schnelle Dialyse ersetzt (Olek, A. et al., Nucl. Acids. Res. 1996, 24, 5064-5066). Mit dieser Methode können einzelne Zellen untersucht werden, was das Potential der Methode veranschaulicht. Allerdings werden bisher nur einzelne Regionen bis etwa 3000 Basenpaare Länge untersucht, eine globale Untersuchung

10 von Zellen auf Tausenden von möglichen Methylierungsanalysen ist nicht möglich. Allerdings kann auch dieses Verfahren keine sehr kleinen Fragmente aus geringen Probenmengen zuverlässig analysieren. Diese gehen trotz Diffusionsschutz durch die Matrix verloren.

15

20 Eine Übersicht über die weiteren bekannten Möglichkeiten, 5-Methylcytosine nachzuweisen, kann aus dem folgenden Übersichtsartikel entnommen werden: Rein, T., DePamphilis, M. L., Zorbas, H., Nucleic Acids Res. 1998, 26, 2255.

25

Die Bisulfit-Technik wird bisher bis auf wenige Ausnahmen (z. B. Zechnick, M. et al., Eur. J. Hum. Gen. 1997, 5, 94-98) nur in der Forschung angewendet. Immer aber werden

30 kurze, spezifische Stücke eines bekannten Gens nach einer Bisulfit-Behandlung amplifiziert und entweder komplett sequenziert (Olek, A. und Walter, J., Nat. Genet. 1997, 17, 275-276) oder einzelne Cytosin-Positionen durch eine „Primer-Extension-Reaktion“ (Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A., Nucl. Acids Res. 1997, 25, 2529-2531, WO-Patent 9500669) oder einen Enzymschnitt (Xiong, Z. und Laird, P.

W., Nucl. Acids. Res. 1997, 25, 2532-2534) nachgewiesen. Zudem ist auch der Nachweis durch Hybridisierung beschrieben worden (Olek et al., WO-A 99/28498).

5 Weitere Publikationen, die sich mit der Anwendung der Bisulfit-Technik zum Methylierungsnachweis bei einzelnen Genen befassen, sind: Xiong, Z. und Laird, P. W. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2532; Gonzalgo, M. L. und Jones, P. A. (1997), Nucl. Acids Res. 25, 2529; Grigg, S. und 10 Clark, S. (1994), Bioassays 16, 431; Zeschnik, M. et al. (1997), Human Molecular Genetics 6, 387; Teil, R. et al. (1994), Nucl. Acids Res. 22, 695; Martin, V. et al. (1995), Gene 157, 261; WO-A 97/46705, WO-A 95/15373 und WO-A 95/45560.

15 Eine Übersicht über den Stand der Technik in der Oligomer Array Herstellung lässt sich aus einer im Januar 1999 erschienenen Sonderausgabe von Nature Genetics (Nature Genetics Supplement, Volume 21, January 1999) und der 20 dort zitierten Literatur entnehmen.

Für die Abtastung eines immobilisierten DNA-Arrays sind vielfach fluoreszenzmarkierte Sonden verwendet worden. Besonders geeignet für Fluoreszenzmarkierungen ist das 25 einfache Anbringen von Cy3 und Cy5 Farbstoffen am 5'-OH der jeweiligen Sonde. Die Detektion der Fluoreszenz der hybridisierten Sonden erfolgt beispielsweise über ein Konfokalmikroskop. Die Farbstoffe Cy3 und Cy5 sind, neben vielen anderen, kommerziell erhältlich.

30 Matrix-assistierte Laser Desorptions/Ionisations-Massenspektrometrie (MALDI-TOF) ist eine sehr leistungsfähige Entwicklung für die Analyse von Biomolekülen (Karas, M. und Hillenkamp, F. (1988), Laser 35 desorption ionization of proteins with molecular masses exceeding 10000 daltons. Anal. Chem. 60: 2299-2301). Ein

Analyt wird in eine lichtabsorbierende Matrix eingebettet. Durch einen kurzen Laserpuls wird die Matrix verdampft und das Analytmolekül so unfragmentiert in die Gasphase befördert. Durch Stöße mit Matrixmolekülen wird 5 die Ionisation des Analyten erreicht. Eine angelegte Spannung beschleunigt die Ionen in ein feldfreies Flugrohr. Auf Grund ihrer verschiedenen Massen werden Ionen unterschiedlich stark beschleunigt. Kleinere Ionen erreichen den Detektor früher als größere.

10 MALDI-TOF Spektrometrie eignet sich ausgezeichnet zur Analyse von Peptiden und Proteinen. Die Analyse von Nukleinsäuren ist etwas schwieriger (Gut, I. G. und Beck, S. (1995)), DNA and Matrix Assisted Laser Desorption

15 Ionization Mass Spectrometry. Molecular Biology: Current Innovations and Future Trends 1: 147-157.) Für Nukleinsäuren ist die Empfindlichkeit etwa 100 mal schlechter als für Peptide und nimmt mit zunehmender Fragmentgröße überproportional ab. Für Nukleinsäuren, die 20 ein vielfach negativ geladenes Rückgrat haben, ist der Ionisationsprozeß durch die Matrix wesentlich ineffizienter. In der MALDI-TOF Spektrometrie spielt die Wahl der Matrix eine eminent wichtige Rolle. Für die Desorption von Peptiden sind einige sehr leistungsfähige 25 Matrices gefunden worden, die eine sehr feine Kristallisation ergeben. Für DNA gibt es zwar mittlererweile einige ansprechende Matrices, jedoch wurde dadurch der Empfindlichkeitsunterschied nicht verringert. Der Empfindlichkeitsunterschied kann verringert werden, 30 indem die DNA chemisch so modifiziert wird, dass sie einem Peptid ähnlicher wird. Phosphorothioatnukleinsäuren, bei denen die gewöhnlichen Phosphate des Rückgrats durch Thiophosphate substituiert sind, lassen sich durch einfache Alkylierungsschemie in 35 eine ladungsneutrale DNA umwandeln (Gut, I. G. und Beck, S. (1995), A procedure for selective DNA alkylation and

detection by mass spectrometry. Nucleic Acids Res. 23: 1367-1373). Die Kopplung eines „charge tags“ an diese modifizierte DNA resultiert in der Steigerung der Empfindlichkeit um den gleichen Betrag, wie er für 5 Peptide gefunden wird. Ein weiterer Vorteil von „charge tagging“ ist die erhöhte Stabilität der Analyse gegen Verunreinigungen, die den Nachweis unmodifizierter Substrate stark erschweren.

10 Genomische DNA wird durch Standardmethoden aus DNA von Zell-, Gewebe- oder sonstigen Versuchspuren gewonnen. Diese Standardmethodik findet sich in Referenzen wie Fritsch und Maniatis eds., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 1989.

15 Die vorliegende Erfindung soll ein besonders effizientes und zuverlässiges Verfahren bereitstellen, das es erlaubt, viele Cytosinbasen in einer gegebenen DNA-Probe gleichzeitig auf das Vorliegen einer Methylgruppe an der 20 Position 5 mittels Hybridisierung zu untersuchen. Dazu werden zudem Oligonukleotide und PNA-Oligomere bereitgestellt, welche für die Verwendung des Verfahrens zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen und der Prädisposition für Erkrankungen durch Analyse eines 25 Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter besonders geeignet sind.

Genetische Parameter im Sinne dieser Erfindung sind Mutationen und Polymorphismen der beanspruchten 30 Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) und zu ihrer Regulation weiterhin erforderliche Sequenzen. Insbesondere sind als Mutationen Insertionen, Deletionen, Punktmutationen, Inversionen und 35 Polymorphismen und besonders bevorzugt SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms) zu bezeichnen. Polymorphismen

können aber ebenso Insertionen, Deletionen oder Inversionen sein.

Epigenetische Parameter im Sinne dieser Erfindung sind

5 insbesondere Cytosin-Methylierungen und weitere chemische Modifikationen von DNA-Basen der beanspruchten Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) und zu ihrer Regulation weiterhin erforderliche Sequenzen. Weitere epigenetische Parameter sind beispielsweise die

10 Acetylierung von Histonen, die jedoch mit dem beschriebenen Verfahren nicht direkt analysiert werden kann, sondern wiederum mit der DNA-Methylierung korreliert.

15 Das vorliegende Verfahren dient zur Detektion des Methylierungsgrades mindestens eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3' einer genomischen DNA-Probe. Besonders bevorzugt wird das Verfahren zur gleichzeitigen Detektion vieler verschiedener

20 Methylierungspositionen verwendet.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß durch ein Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3' einer genomischen DNA-Probe gelöst, welches dadurch gekennzeichnet ist, dass

25 a) man die genomische DNA behandelt, wobei man die Cytosinbasen in Uracil umwandelt, nicht aber die 5-Methylcytosinbasen;

= 30 b) man Teile der genomischen DNA amplifiziert, die das besagte bestimmte Cytosin enthalten, wobei die Amplifikate eine nachweisbare Markierung erhalten;

= c) man die Amplifikate an zwei Klassen von

Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren mit jeweils mindestens einem Mitglied hybridisiert;

d) man das Ausmaß der Hybridisierung der Amplifikate an die zwei Klassen von Oligonukleotiden durch Detektion der

5 Markierung der Amplifikate bestimmt;

e) man aus dem Verhältnis der an den zwei Klassen von Oligonukleotiden in Folge der Hybridisierung detektierten Markierungen auf den Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA-Probe

10 schliesst.

Besonders bevorzugt ist dabei ein Verfahren, bei dem man in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied durchführt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA

15 methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge. Eine dieser zwei Klassen von

20 Oligomeren koennen beispielsweise durch Oligonukleotide, die ein CG in der Mitte enthalten gebildet werden und die andere Klasse durch Oligonukleotide, welche in der Mitte ein TG (oder ein CA, im Gegenstrang) aufweisen. Die restlichen Teile der Oligomersequenzen sollten zwischen

25 beiden Klassen bevorzugt übereinstimmen. In diesem Fall würden Oligonukleotide der ersten Klasse an die Sequenz (um das zu untersuchende bestimmte Cytosin) hybridisieren, wie sie nach Bisulfit Umsetzung in methylierten Fall vorläge, umgekehrt würden die der

30 zweiten Klasse an die Sequenz hybridisieren, wie sie nach Bisulfit Umsetzung in unmethylierten Fall vorläge.

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied durchführt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von dem Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.

Ensprechend ist auch ein Verfahren bevorzugt, bei dem man in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von dem Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.

In diesen Fällen hybridisiert also die zweite Klasse von Oligomeren an das Amplifikat, ohne dass sich eine wesentliche Methylierungsspezifität ergibt, demnach also bevorzugt an eine Position des Amplifikates die keinen 5 methylierbaren Cytosin Positionen entspricht. Damit wird letztlich nur die Konzentration des Amplifikates über die Intensität der Hybridisierung bestimmt. Relativ dazu erfolgt die Hybridisierung an die erste Klasse von Oligonukleotiden in Abhängigkeit von dem 10 Methylierungsgrad der zu untersuchenden bestimmten Cytosins.

Bevorzugt ist es, dass man das Verfahren nicht nur mit der genomischen DNA-Probe durchführt, sondern sinngemäß 15 auch mit bekanntermaßen an der Position des besagten bestimmten Cytosins methyliert oder aber unmethyliert vorliegender Standard-DNA, wobei die jeweils mit der unmethylierten Standard DNA gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten 20 Markierungen als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 0 und entsprechend die jeweils mit der methylierten Standard DNA gemäss gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 25 1 dienen und man diese Eichwerte für die Bestimmung des Methylierungsgrades der genomischen Proben-DNA einsetzt.

Besonders bevorzugt ist es, dass man weitere bekannte Standard DNA-Proben zur Eichung verwendet, die jeweils 30 einen beliebigen bekannten Methylierungsgrad des besagten bestimmten Cytosins aufweisen.

Die verwendeten Standard DNA-Proben und die Probe (das aus einer genomischen DNA hergestellte Amplifikat) sind 35 bevorzugt jeweils unterschiedlich markiert. Die

verwendeten Standard DNA Proben sind jeweils wiederum bevorzugt unterschiedlich markiert.

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man

5 Amplikate, hervorgegangen aus verschiedenen genomischen DNA-Proben, mit unterschiedlichen Markierungen versieht. In diesem Fall ist es möglich, mit einem Satz von Oligonukleotiden der beiden Klassen gleichzeitig verschiedene Proben zu messen, sei es beispielsweise auf

10 einem Oligomer Array, welcher Oligonukleotide der beiden Klassen enthält.

Beisnders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man Amplikate, hervorgegangen aus derselben genomischen DNA-Proben, mit unterschiedlichen Markierungen versieht, um über eine Mittelung der aus verschiedenen Detektionsverfahren erhaltenen Werte eine Erhöhung der Messgenauigkeit zu erreichen. Dies kann beispielsweise durch Markierungen mit unterschiedlichen

20 Fluoreszenzfarbstoffen erfolgen. Die Messung erfolgt in diesem Fall mittels eines Fluoreszenzscanners, welcher über mehrere Kanäle zur Messung der individuellen Emissionswellenlängen der Fluoreszenzfarbstoffe verfügt.

25 Besonders bevorzugt ist demnach auch ein Verfahren, bei dem die Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.

Bevorzugt ist es erfindungsgemäß ferner, dass besagte Markierung eine Fluoreszenzmarkierung ist. Dabei ist

30 bevorzugt, dass man besagte Markierung durch Chemilumineszenz, ihre UV-Absorption oder Fluoreszenzpolarisation nachweist.

Ganz besonders ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass man

35 die Behandlung der DNA in Schritt a) mit einer Lösung eines Bisulfits (=Hydrogensulfit, Disulfit) durchführt.

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren, bei dem man für die Amplifikation Oligonukleotide verwendet, die einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer 5 chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 umfassen. Damit wird sichergestellt, dass man zu bisulfit behandelter DNA komplementäre Primer verwendet, welche in der Lage sind, regulatorische Regionen (CpG inseln) zu amplifizieren, welche dann 10 nachfolgend hinsichtlich Methylierung untersucht werden können.

Besonders bevorzugt ist auch ein Verfahren bei dem man in einem Hybridisierungsschritt Oligonukleotide und/oder 15 Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomere verwendet, die an einen mindestens 9 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 hybridisieren oder diesem entsprechen, wobei die Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid 20 umfaßt und sich das CpG Dinukleotid in etwa im mittleren Drittel des Oligomers befindet. Diese Oligonukleotide sind geeignet, spezifische CpG Positionen hinsichtlich ihres Methylierungsgrades gemäß dem erfindungsgemäßem Verfahren zu untersuchen. Sie binden bevorzugt an die 25 Amplifikate behandelter DNA, welche aus einer an der betreffenden Cytosin Positionen methylierten genomischen DNA Probe hervorgingen.

Bevorzugt ist auch, dass die Markierungen Radionuklide 30 sind.

Bevorzugt ist ferner, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, dass man die PCR-Produkte insgesamt oder deren charakteristische Fragmente im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

5

Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, dass die Oligomere (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) einer Klasse die Sequenz 5'-CG-3' umfassen.

10 Erfindungsgemäß besonders bevorzugt ist es, dass die Oligomere (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) einer Klasse die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3' umfassen.

15 Besonders bevorzugt ist es ferner auch, dass die Oligonukleotide der ersten Klasse die Sequenz 5'-CG-3' umfassen und die Oligonukleotide der zweiten Klassen die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3' umfassen.

20 Bevorzugt ist es auch, dass die Oligonukleotide der ersten und der zweiten Klasse auf einer gemeinsamen Festphase immobilisiert sind. Auch ist dabei bevorzugt, dass die Oligonukleotide auf einer ebenen Festphase in einem rechtwinkligen oder hexagonalen Raster angeordnet sind und der Ort bestimmter Oligonukleotide auf der Festphase mit deren jeweiliger Sequenz korreliert ist.

25

Ebenfalls besonders bevorzugt ist es, dass die Oligomere der ersten und zweiten Klasse auf Beads immobilisiert sind, welche mit einem Satz getrennt nachweisbarer Markierungen codiert sind. Letztere dienen zur Identifizierung des Beads, d.h. der an das betreffende Bead gebundenen Sequenzen. Die an die Beads gebundenen Amplifikate werden dann mittels anderer Markierungen, welche an die Amplifikate gebunden sind, identifiziert. Instrumente zur Durchführung solcher Messungen basierend

auf Beads werden beispielsweise von der Firma Luminex angeboten.

Ganz besonders bevorzugt ist ein erfindungsgemäßes

5 Verfahren, wobei man den Schritt b) in zwei Teilschritten wie folgt durchführt:

a) eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die an eine nach Anspruch 1 vorbehandelte DNA-Probe unspezifisch

10 hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben;

b) eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz, die jeweils zu einem Abschnitt der nach Anspruch

15 1 vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers komplementär sind und an die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

Unter Hybridisierung wird im Zusammenhang dieser

20 Erfindung eine Hybridisierung zweier gemäß den Watson-Crick Regeln vollständig zueinander revers komplementärer DNA-Einzelstränge verstanden, ohne dass eine Basenfehlpaarung auftritt. Uracil wird in diesem Zusammenhang wie Thymin betrachtet.

25

Erfindungsgemäß bevorzugt ist es ferner, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt wird.

30 Weiterhin ist erfindungsgemäß bevorzugt, dass für die Amplifikation eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet wird. Besonders bevorzugt ist auch, dass die für die Amplifikation verwendeten Primeroligonukleotide der entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen

35 T, A und G enthalten.

Bevorzugt ist es auch, dass mindestens 10 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Besonders bevorzugt ist es, dass mindestens 50 CpG Positionen in unterschiedlichem

5 Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Ganz besonders bevorzugt ist es, dass mindestens 100 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Höchst bevorzugt ist es, dass mindestens 500 CpG Positionen in unterschiedlichem

10 Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Am bevorzugsten ist es, dass mindestens 1000 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden.

15 Erfindungsgemäß bevorzugt ist das Verfahren, wobei die genomische DNA-Probe aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder

20 Leber, histologischen Objektträgern oder allen möglichen Kombinationen hiervon erhalten wurde.

Bevorzügt ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen Verfahrens zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung,

Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz;
Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als
Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion,
Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des
5 Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische
Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen
oder sexuelle Fehlfunktion.

Weiterhin ist die Verwendung eines erfindungsgemäßen
10 Verfahrens zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben
oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung bevorzugt.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein Kit,
umfassend ein Bisulfit enthaltendes Reagenz,
15 Primeroligonukleotiden zur Herstellung der Amplifikate
und/oder vorzugsweise an einer Festphase immobilisierte
Oligonukleotiden sowie eine Anleitung zur Durchführung
des erfindungsgemäßen Verfahrens. Die
Primeroligonukleotide und die immobilisierten
20 Oligonukleotide werden wie oben beschrieben aus den Seq.
IDs 1 bis 40712 abgeleitet.

Diese genomische DNA-Probe wird bevorzugt aus Zelllinien,
Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-
25 Flüssigkeit, in Paraffin einbettetem Gewebe,
beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz,
Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen
Objektträgern oder allen möglichen Kombinationen hiervon
erhalten.

30 Bei diesem Verfahren wird im ersten Schritt eine
genomische DNA-Probe derart behandelt, dass außer den 5-
= Methylcytosinbasen alle Cytosinbasen in Uracil
umgewandelt werden. Diese chemische Behandlung wird
35 bevorzugt mit der Lösung eines Bisulfits
(=Hydrogensulfit, Disulfit) durchgeführt.

Dieser Verfahrensschritt kann nicht nur mit der genomischen DNA-Probe durchgeführt werden, sondern vorzugsweise sinngemäß auch mit bekanntermaßen an der 5 Position des besagten bestimmten Cytosins methyliert oder aber unmethyliert vorliegender Standard-DNA.

Im zweiten Schritt des Verfahrens werden die Teile der genomischen DNA amplifiziert, die das besagte bestimmte 10 Cytosin enthalten. Dieser Schritt kann besonders bevorzugt in zwei Teilschritten durchgeführt werden:

1. Zuerst wird eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz durchgeführt, 15 die an eine chemisch vorbehandelte DNA hybridisieren. Diese Vorbehandlung erfolgte chemisch derart, dass die Cytosinbasen in Uracil umgewandelt wurden, nicht aber die 5-Methylcytosinbasen.
- 20 2. Eine PCR-Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts wird mit Primern unterschiedlicher Sequenz durchgeführt. Diese Primer sind identisch oder revers komplementär zu einem Abschnitt des chemisch vorbehandelten DNA [(+)-Strangs oder (-)-Strangs] und 25 hybridisieren spezifisch an die zu amplifizierende DNA. Die Amplifikate enthalten vorzugsweise eine nachweisbare Markierung.

Im folgenden dritten Schritt des Verfahrens erfolgt eine 30 Hybridisierung der Amplifikate an bevorzugt zwei Klassen von Oligonukleotiden mit jeweils mindestens einem Mitglied. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens umfassen die Oligonukleotide der ersten Klasse die Sequenz 5'-CG-3' und die Oligonukleotide der zweiten 35 Klasse die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3'. Die Oligonukleotide der ersten und der zweiten Klasse

sind vorzugsweise auf einer gemeinsamen Festphase immobilisiert. Die Oligonukleotide sind auf einer ebenen Festphase in einem rechtwinkligen oder hexagonalen Raster angeordnet und der Ort der bestimmten Oligonukleotide ist 5 auf der Festphase mit der jeweiligen Sequenz korreliert.

Die Oligonukleotide der ersten Klasse hybridisieren bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das 10 besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge. Die Oligonukleotide der zweiten Klasse hybridisieren bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA 15 unmethyliert vorläge.

Die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten wird besonders bevorzugt in einem Reaktionsgefäß durchgeführt. Bevorzugt führt man die Amplifikation mit der 20 Polymerasekettenreaktion (PCR) durch, wobei vorzugsweise eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet wird.

Die für die Amplifikation verwendeten Primeroligonukleotide enthalten bevorzugt entweder nur 25 die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G.

Im vierten Verfahrensschritt wird das Ausmaß der Hybridisierung der Amplifikate an die zwei Klassen von Oligonukleotiden durch die Detektion der Markierungen der 30 Amplifikate bestimmt. Die Markierungen sind besonders bevorzugt Fluoreszenzmarkierungen, Radionuklide oder ablösbare Massenmarkierungen, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden. Die Markierung werden vorzugsweise ebenfalls durch Chemilumineszenz, UV- 35 Absorption oder Fluoreszenzpolarisation nachgewiesen. Die PCR-Produkte können auch bevorzugt insgesamt oder als

deren charakteristische Fragmente im Massenspektrometer nachgewiesen werden. Somit sind die PCR-Produkte durch ihre Masse eindeutig charakterisiert.

5 Im letzten Verfahrensschritt wird aus dem Verhältnis der an den zwei Klassen von Oligonukleotiden in Folge der Hybridisierung detektierten Markierungen auf den Methylierungsgrad des besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA-Probe geschlossen.

10 Die jeweils mit der unmethylierten Standard-DNA gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen dienen vorzugsweise als Eichwert für einen Methylierungsgrad von
15 0.

Entsprechend dienen die jeweils mit der methylierten Standard-DNA gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen
20 vorzugsweise als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 1. Diese Eichwerte werden besonders bevorzugt für die Bestimmung des Methylierungsgrades der genomischen DNA-Proben eingesetzt.

25 Für die Eichung können vorzugsweise auch weitere bekannte Standard DNA-Proben zur Eichung verwendet werden, die jeweils einen beliebigen bekannten Methylierungsgrad des besagten bestimmten Cytosins aufweisen.

30 Das Verfahren ist dadurch charakterisiert, dass bevorzugt mindestens 10 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden. Ferner können vorzugsweise mindestens 50 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert
35 werden. Bevorzugt ist außerdem, dass mindestens 100 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext

gleichzeitig analysiert werden. Sehr bevorzugt ist die gleichzeitige Analyse von mindestens 500 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext. Besonders bevorzugt ist abschließend die gleichzeitige Analyse von mindestens 5 1000 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext.

Das beschriebene Verfahren wird bevorzugt verwendet zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien 10 angehören: unerwünschte Arzneimittelwirkungen; Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von 15 Gehirnschädigungen; psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder 20 Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des 25 Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

Das vorliegende Verfahren wird besonders bevorzugt 30 verwendet zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

Durch Bestimmung der Hybrisierungsverhältnisse zwischen den zwei eingesetzten Klassen von Oligonukleotiden (z.B. 35 enthaltend CG/TG) wird Unabhängigkeit von der Intensität

der Gesamthybridisierung der unbekannten Gewebeproben erreicht.

Zur Kalibrierung von unbekannten Gewebeproben werden 5 unmethylierte und aufmethylierte Vergleichsproben als Standards eingesetzt.

Bestandteil dieses Verfahrens ist ferner ein Kit, das ein Bisulfit enthaltendes Reagenz, Primeroligonukleotide zur 10 Herstellung der Amplifikate und/oder vorzugsweise an eine Festphase immobilisierte Oligonukleotide umfasst. Die Oligonukleotide (erste Klasse) umfassen die Sequenz 5'-CG-3'. Die Oligonukleotide (zweite Klasse) umfassen die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3'. Zu dem 15 Kit gehört auch eine Anleitung zur Durchführung des Verfahrens.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind weiterhin die Nukleinsäuren, die sich für die Durchführung des 20 Verfahrens besonders eignen.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Satz von mindestens 10 Oligomersonden (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren), die zur Detektion des Cytosin- 25 Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter genomischer DNA (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) dienen. Mit diesen Sonden ist die Analyse eines Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder für die Diagnose der 30 Prädisposition für bestimmte Erkrankungen möglich.

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein mindestens 18 Basen langer Sequenzabschnitt einer behandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 35 40712. Diese 18 Basenpaare lange Abschnitte aus Seq. ID 1

bis Seq. ID 40712 werden für die Amplifikation der behandelten genomischen DNA benutzt. Als Detektoren für diese Abschnitte werden Oligomere mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden verwendet.

5

Die Oligomere enthalten bevorzugt mindestens ein CpG Dinukleotid. Das Cytosin des entsprechenden CpG Dinukleotids befindet sich in etwa im mittleren Drittel des Oligomers. Entscheidend ist, dass im jeweiligen Satz 10 von Oligomeren für zumindest jedes der CpG Dinukleotide mindestens ein Oligonukleotid aus Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 vorhanden ist.

Die Oligomere werden bevorzugt auf einem Trägermaterial 15 in einer fixierten Anordnung hergestellt, wobei mindestens ein Oligomer an eine feste Phase gekoppelt wird. Verfahren zur Bindung von Oligomersonden an Festphasen sind dem Fachmann bekannt.

20 Wichtig ist in diesem Zusammenhang ferner, dass man zur Diagnose von genetischen und/oder epigenetischen Parametern der beanspruchten Nukleinsäuren (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) nicht einzelne CpG Dinukleotide, sondern die eine grosse Anzahl der in den Sequenzen vorhandenen 25 CpG Dinukleotide analysieren muss. In einer besonders bevorzugten Variante des Verfahrens sind alle in den Sequenzen vorhandenen CpG Dinukleotide zu untersuchen.

Wiederum bevorzugt ist es, dass alle Oligomersonden die 30 gleiche Länge haben. Besonders bevorzugt sind weiterhin alle 18mere, welche ein CG Dinukleotid in der Mitte

aufweisen und die an eine der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 ohne Basenfehlpaarungen hybridisieren.

In einer wiederum bevorzugten Variante des Verfahrens

5 werden mindesten zehn der Oligomere zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in chemisch vorbehandelter genomicscher DNA verwendet.

10 Die Oligomere werden vorzugsweise verwendet zur Diagnose von unerwünschten Arzneimittelwirkungen, Krebserkrankungen, CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Erkrankungen, aggressiven Symptomen oder Verhaltensstörungen, klinischen, psychologischen und

15 sozialen Folgen von Gehirnverletzungen, psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen, Demenz und/oder assoziierten Syndromen, kardiovaskulärer Krankheit, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des gastrointestinalen Traktes, Fehlfunktion, Schädigung oder

20 Erkrankung des Atmungssystems, Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess, Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung der Haut, der Muskeln, des

25 Bindegewebes oder der Knochen, endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Erkrankung, Kopfschmerzen und sexuellen Fehlfunktionen durch Analyse von Methylierungsmustern.

30 Auch von den im Sequenzprotokoll aufgelisteten Nukleinsäuren oder erheblichen Teilen davon (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) wird vorzugsweise mindestens eine

verwendet für die Analyse eines Satzes genetischer und/oder epigenetischer Parameter zur Diagnose von bestehenden Erkrankungen oder für die Diagnose der Prädisposition für bestimmte Erkrankungen.

5

Dem Fachmann wird verständlich sein, dass die Oligomere bei einem Austausch von Thymin gegen Uracil in den verwendeten Sequenzen den gleichen Zweck erfüllen.

- 10 Die zu analysierende genomische DNA wird bevorzugt aus den üblichen Quellen für DNA erhalten, wie z. B. Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin eingebettetes Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologische Objektträger und alle möglichen Kombinationen hiervon.

- 20 Gegenstand der vorliegenden Erfindung sind auch Nukleinsäuren, umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712.

- 25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Oligomer (Oligonukleotid oder Peptide Nucleic Acid (PNA)-Oligomer) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter DNA, umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an eine chemisch vorbehandelte DNA (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) hybridisiert. Dabei ist es erfindungsgemäß bevorzugt, dass die Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid umfasst. Bevorzugt ist dabei auch, dass das Cytosin des CpG Dinukleotids in etwa im mittleren Drittel des
- 30 Oligomers befindet.
- 35

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Satz von erfindungsgemäßen Oligomeren, umfassend mindestens ein Oligomer für zumindest eines der CpG Dinukleotide einer

5 der Sequenzen der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712. Bevorzugt ist dabei, ein Satz von Oligomeren, umfassend für jedes der CpG Dinukleotide aus einer der Sequenzen der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 mindestens ein Oligomer.

10 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Satz von mindestens zwei Nukleinsäuren, die als Primeroligonukleotide zur erfindungsgemäßen Amplifikation mindestens einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 oder Abschnitten davon eingesetzt werden. Dabei ist bevorzugt,

15 dass mindestens ein Oligonukleotid an eine Festphase gebunden ist.

Gegenstand der Erfindung ist auch ein Satz von Oligomersonden zur Detektion des Cytosin-

20 Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) in chemisch vorbehandelter genomischer DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712, umfassend mindestens zehn der erfindungsgemäßen oben genannten Oligomere.

25 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ferner ein Verfahren zur Herstellung einer auf einem Trägermaterial fixierten Anordnung von unterschiedlichen Oligomeren (Array) zur Analyse von in Zusammenhang mit dem

30 Methylierungszustandes der CpG Dinukleotide einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 stehenden Erkrankungen, bei dem mindestens ein Oligomer erfindungsgemäß an eine feste Phase gekoppelt wird.

Gegenstand der Erfindung sind auch an eine Festphase gebundene Anordnungen von unterschiedlichen erfindungsgemäßen Oligomeren (Array).

- 5 Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist auch ein Array von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen wobei diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind. Bevorzugt ist dabei, dass die
- 10 Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

Erfindungsgemäß ist auch ein DNA- und/oder PNA-Array zur Analyse von in Zusammenhang mit dem Methylierungszustand von Genen stehenden Erkrankungen, der mindestens eine erfindungsgemäße wie oben beschriebene Nukleinsäure beinhaltet.

- 20 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

Beispiel 1:

Herstellung von nicht- und aufmethylierter DNA und Bisulphit-Behandlung

25 Für die Herstellung aufmethylierter DNA wurden humane genomische DNA mit S-Adenosylmethion und der CpG Methylase (SssI, New England Biolabs,) nach Angaben des Herstellers behandelt. Für die Herstellung nicht-methylierter DNA wurde das Genfragment ELK-1 (Accession number ep59011) mit den Primer GCTCTATGGTCTTGTCTAACCGTA und AGGTGGTGGTGGCGGTGG ausgehend von humaner genomischer DNA, mittels PCR amplifiziert. Die so hergestellte nicht- und aufmethylierter DNA, wie auch humane genomische DNA, 30 wurde unter Verwendung von Bisulphit (Hydrogensulfit, 35

Disulfit) derart behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion Bisulfit im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 M und 6 M verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen.

15

Beispiel 2:

Herstellung der Cy5-markierten Gensonden

20 Ausgehend von den Bisulphit behandelten DNA Proben wird je ein definiertes Fragment der Länge 529 bp aus der Promoterregion des ELK-1 Gens amplifiziert (Accession number ep59011). Die Amplifikation wird mit den Primeroligonukleotiden ATGGTTTGTAAATYGTAGAGTTGTTT und
25 TAAACCCRAAAAAAAACCCAATAT durchgeführt. Durch Verwenden von Primeroligonukleotiden, die mit dem Fluoreszenfarbstoff Cy5 markiert sind, wird das Fragment direkt bei der PCR markiert. Als Matrix DNA wird Bisulphit (Hydrogensulfit, Disulfit) behandelte (1) nichtmethylierte, (2) aufmethylierte und (3) humane
30 genomische DNA verwendet. Anschließend werden diese drei unterschiedlichen DNA-Fragmente in getrennten Hybridisierungen auf ihren Methylierungsgrad an einer spezifischen CpG Position untersucht.

35

Beispiel 3:

Durchführung der Hybridisierung und Auswertung eines hybridisierten DNA-“Chip”

- 5 Die in Beispiel 2 hergestellte Gensonden wird auf einem DNA Chip hybridisiert. Auf dem Chip sind zuvor Oligonukleotide immobilisiert worden. Die Oligonukleotidsequenzen leiten sich von dem in Beispiel 2 genannten amplifizierten Fragment des Gens ELK-1 ab,
- 10 und repräsentierten die CG Dinukleotide, die unmittelbare Umgebung einschließend. Die Länge der Oligonukleotide beträgt 14-22 Nukleotide, die Position des CG Dinukleotides innerhalb der Oligonukleotide ist variabel. Nach der Hybridisierung wird der DNA Chip gescannt (siehe
- 15 Fig. 1) und die Hybridisierungssignale numerisch ausgewertet (Daten nicht gezeigt). Das Ergebnis der Hybridisierung für die Oligonukleotide CTACTAACGAAAACAAA und CTACTAACAAAAACAAA wird in Fig. 1 und Fig. 2 gezeigt. Hierbei hybridisiert CTACTAACGAAAACAAA bevorzugt, wenn
- 20 das zu Cytosin des ELK-1 Fragments, welches sich an Position 103 des Amplifikates befindet, methyliert ist, CTACTAACAAAAACAAA wenn dieses Cytosin nicht-methyliert ist.
- 25 In Figur 1 ist ein DNA Chip nach Hybridisierung mit dem ELK-1 Fragment dargestellt. Dargestellt ist das Falschfarben-Bild wie es nach dem Scannen erzeugt wird. Entgegen der hier dargestellten schwarz-weiß Abbildung wird von dem Scanner ein farbiges Bild erzeugt. Die
- 30 Intensität der verschiedenen Farben repräsentiert den Grad der Hybridisierung, wobei der Hybridisierungsgrad von rot (in Figur 1 als helle Spots zu erkennen) nach blau (in Figur 1 als dunkle Spots zu erkennen) abnimmt.
- 35 Figur 2 A stellt eine Teilabbildung von Figur 1 dar. Zur Verdeutlichung des Hybridisierungsschemas sind die

gespotteten Oligonukleotidpaare weiß umrandet:
 ctactcaacaaaaacaaa (links) und ctactcaacgaaaaacaaa
 (rechts).

5 Teilabbildung Figur 2 B zeigt das Spottingmuster für einen unbekannten Methylierungsstatus der Gewebeprobe und Teilabbildung Figur 2 C den Methylierungsstatus für die aufmethylierte Vergleichsprobe.

10 Tabelle 1:

	Probe A (unmethyliert)		Probe B (unbekannt)		Probe C (aufmethyliert)	
Sequenz des Detektionsoligomers	Fluoreszenz (counts)	Mittelwert	Fluoreszenz (counts)	Mittelwert	Fluoreszenz (counts)	Mittelwert
ctactcaacgaaaaacaaa	3352		6102		6002	
ctactcaacgaaaaacaaa	2950		6775		7898	
ctactcaacgaaaaacaaa	4196		6360		7485	
ctactcaacgaaaaacaaa	5181		5521		11401	
		3920		6190		8197
ctactcaacaaaaacaaa	20577		7074		7290	
ctactcaacaaaaacaaa	19709		9171		9985	
ctactcaacaaaaacaaa	24130		7603		9286	
ctactcaacaaaaacaaa	21601		9434		12435	
		21504		8321		9749
CG/CA		0,28		0,74		0,84

Der Mittelwert ist jeweils für eine Wellenlänge von 635 nm angegeben. In Spalte A werden die Werte für die 15 unmethylierte Probe, in Spalte B für einen unbekannten Methylierungsstatus einer Gewebeprobe und in Spalte C die Werte für die aufmethylierte Vergleichsprobe. Die CG/CA - Verhältnisse repräsentieren den Methylierungsstatus der - jeweiligen Probe. Der Wert von 0,74 zeigt, dass die Probe 20 im wesentlichen in aufmethylierter Form vorliegt.

Beispiel 4:

Das folgende Beispiel bezieht sich auf ein Fragment des mit dem vererbaren non-polyposis Colorektalkrebs 5 assoziierten Gens hMLH1, in dem eine bestimmte CG-Position auf Methylierung untersucht wird.

Im ersten Schritt wird eine genomische Sequenz unter Verwendung von Bisulfit (Hydrogensulfat, Disulfat) derart 10 behandelt, dass alle nicht an der 5-Position der Base methylierten Cytosine so verändert werden, dass eine hinsichtlich dem Basenpaarungsverhalten unterschiedliche Base entsteht, während die in 5-Position methylierten Cytosine unverändert bleiben. Wird für die Reaktion 15 Bisulfit im Konzentrationsbereich zwischen 0.1 M und 6 M verwendet, so findet an den nicht methylierten Cytosinbasen eine Addition statt. Zudem müssen ein denaturierendes Reagenz oder Lösungsmittel sowie ein Radikalfänger zugegen sein. Eine anschließende alkalische 20 Hydrolyse führt dann zur Umwandlung von nicht methylierten Cytosin-Nukleobasen in Uracil. Diese umgewandelte DNA dient dazu, methylierte Cytosine nachzuweisen. Im zweiten Verfahrensschritt verdünnt man die behandelte DNA-Probe mit Wasser oder einer wässrigen 25 Lösung. Bevorzugt wird anschliessend eine Desulfonierung der DNA (10-30 min, 90-100 °C) bei alkalischem pH-Wert durchgeführt. Im dritten Schritt des Verfahrens amplifiziert man die DNA-Probe in einer Polymerasekettenreaktion, bevorzugt mit einer 30 hitzebeständigen DNA-Polymerase. Im vorliegenden Beispiel werden Cytosine des Gens hMLH1, hier aus einer 1551 bp großen 5' flankierenden Region, untersucht. Dazu wird mit den spezifischen Primeroligonukleotiden AGCAACACCTCCATGCACTG und TTGATTGGACAGCTTGAATGC ein 35 definiertes Fragment der Länge 719 bp amplifiziert. Dieses Amplifikat dient als Probe, die an ein vorher an

einer Festphase gebundenes Oligonukleotid unter Ausbildung einer Duplexstruktur hybridisiert, beispielsweise GAAGAGCGGACAG, wobei sich das nachzuweisende Cytosin an Position 588 des Amplifikats 5 befindet. Der Nachweis des Hybridisierungsprodukts beruht auf Cy3 und Cy5 fluoreszenzmarkierten Primeroligonukleotiden, die für die Amplifikation verwendet wurden. Nur wenn in der Bisulfit behandelten DNA an dieser Stelle ein methyliertes Cytosin vorgelegen 10 hat, kommt es zu einer Hybridisierungsreaktion der amplifizierten DNA mit dem Oligonukleotid. Somit entscheidet der Methylierungsstatus des jeweiligen zu untersuchenden Cytosins über das Hybridisierungsprodukt.

15 Beispiel 5:

Herstellung von durch Bisulfit modifizierter DNA durch Agarose beads

In dem vorliegenden Experiment wird, ausgehend von mit 20 Bisulfit behandelter DNA, ein definiertes Fragment der Länge 529 bp aus der Promoterregion des ELK-1 Gens (Accession number ep59011) amplifiziert. Durch Verwenden der Primeroligonukleotide ATGGTTTGTAAATYGTAGAGTTGTT und TAAACCCRAAAAAAAACCAATAT, die mit dem 25 Fluoreszenzfarbstoff ALEXA 488 markiert sind, wird das Fragment direkt bei der PCR markiert. Oligonukleotide der ersten Klasse (hier beispielsweise ATTAATAGCGTTGGTT) und der zweiten Klasse (hier: beispielsweise ATTAATAGTGTGTTGGTT) werden an den Oberflächen von beads 30 immobilisiert, die sich durch eine individuelle Farbkodierung unterscheiden. In einem folgenden Schritt werden die mit den oben genannten Primeroligonukleotiden hergestellten Amplifikate des Gens ELK-1, mit einem Gemisch beider Klassen der beads zusammengebracht, wobei 35 die Amplifikate gegen die immobilisierten Oligonukleotide, hier beispielsweise ATTAATAGCGTTGGTT

und ATTAATAGTGTGTTGGTT, wobei sich das nachzuweisende C bzw. T jeweils an Position 476 des Amplifikats befindet, hybridisieren. Anschließend werden die beads vereinzelt, dann durch Fluoreszenzmessung anhand ihrer Farbkodierung 5 identifiziert und durch Messung der Fluoreszenzintensitäten, die spezifisch für den Fluoreszenzfarbstoff ALEXA 488 sind, der Grad der Hybridisierung ermittelt.

10 Beispiel 6:

Verwendung von multiplen Farbstoffen zur internen Kalibrierung

Ausgehend von mit Bisulfit behandelter DNA wird ein 15 definiertes Fragment der Länge 529 bp aus der Promoterregion des ELK-1 Gens amplifiziert. Durch Verwenden fluoreszenzmarkierter Primeroligonukleotide ATGGTTTGTAAATYGTAGAGTTGGTT und TAAACCCRAAAAAAAACCCAATAT, wird das Fragment direkt bei 20 der PCR markiert. Für die PCR Reaktion, die auf einem Thermocycler (Eppendorf GmbH) durchgeführt wird, werden 10 ng von mit Bisulfit behandelter DNA, 6 pmol je Primer, 200 µM je dNTP, 1.5 mM MgCl₂ und 1 U HotstartTaq (Qiagen AG) eingesetzt. Die übrigen Bedingungen werden den 25 Herstellerangaben gemäß gewählt. Für die Amplifikation wird eine Denaturierung für 14 min bei 96 °C durchgeführt, woran sich 39 Zyklen mit den Bedingungen 60 sec bei 96 °C, 45 sec bei 55 °C und 75 sec bei 72 °C anschließen. Zum Schluss wird eine Elongation für 10min bei 72 °C 30 durchgeführt. Im vorliegenden Fall werden die zu untersuchenden Proben, hier Gewebe von gesunden und kranken Personen, mit dem Farbstoff Cy2 markiert. Zur internen Kalibrierung des Methylierungsstatus werden Primeroligonukleotide zur Amplifikation der Proben für 35 die Kalibrierung verwendet, die mit den Fluoreszenzfarbstoffen Cy3 und Cy5 markiert sind. Die

Amplifikate aus den Proben für die Kalibrierung repräsentieren einen bekannten Methylierungsstatus, zum einen, einen Zustand hundertprozentiger Methylierung und zum anderen einen nicht-methylierten Zustand. Da bei 5 diesem Verfahren die Verhältnisse der Farbintensitäten der Fluoreszenzfarbstoffe, die unter Verwendung des ScanArray 4000XL, Packard BioScience-BioChip Technologies, gemessen werden, zwischen zwei Klassen von Oligonukleotiden, hier beispielsweise ATTAATAGCGTTGGTT 10 und ATTAATAGTGTGTTGGTT, wobei sich das nachzuweisende C bzw. T jeweils an Position 476 des Amplifikats befindet, berechnet werden, kann, das Verhältnis von methyliertem zu nicht methyliertem Zustand der unbekannten Proben ermittelt werden.

15

Beispiel 7:

Verwendung von multiplen Farbstoffen zur Erhöhung des Probendurchsatzvolumens und zur Erhöhung der Analysekomplexität

20

Das vorliegende Experiment dient dazu, verschiedene Proben in einem einzigen Hybridisierungsschritt zu analysieren und dadurch das Probendurchsatzvolumen zu erhöhen. Dazu wird von vier Individuen jeweils aus der 25 Promotorregion des Gens ELK-1 jeweils ein definiertes Fragment der Länge 529 bp ausgehend von mit Bisulfit behandelter DNA, mit den Primeroligonukleotiden ATGGTTTGTTAATYGTAGAGTTGGTT und TAAACCCRAAAAAAAACCCAATAT, amplifiziert. Diese von den 30 vier Individuen stammenden Fragmente werden mit den vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen Cy3, Cy5, Cy2 und Cy7 markiert und gegen immobilisierte Oligonukleotide, hier beispielsweise ATTAATAGCGTTGGTT und ATTAATAGTGTGTTGGTT, wobei sich das nachzuweisende C bzw. T jeweils an 35 Position 476 des Amplifikats befindet, hybridisiert. Diese verschiedenen fluoreszenzmarkierten Proben werden

anschließend bei unterschiedlichen Wellenlängen analysiert, ohne dass es zu einer gegenseitigen, auf einer Fluoreszenzfarbstoff basierenden Beeinflussung, kommt.

5 Umgekehrt ist es auch möglich, aus einer DNA Probe verschiedene unterschiedliche Sätze von Fragmenten zu erzeugen, die mit unterschiedlichen Farbstoffen markiert sind, hier Cy2, Cy3 und Cy5. Wird ein Satz von Oligonukleotidsonden für 64 Gene (Satz 1) auf einem Chip 10 immobilisiert, so ist die Spezifität ausreichend, um 64 z.B. Cy3 markierte Fragmente unabhängig voneinander zu analysieren.. Dadurch, dass hier Proben von Satz 1 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy3 und Proben von Satz 2 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Cy5 markiert werden (und Satz 3 15 mit Cy2), wird die Detektion des Methylierungsstatus über die Fragmente des Satzes 1 bei der Messung der Fluoreszenzintensitäten nicht durch die fluoreszenzmarkierten Amplifikate der Sätze 2 und 3 beeinflusst (und umgekehrt). Damit ist es möglich, trotz 20 erhöhter Komplexität der Amplifikate gleichermaßen zuverlässige Daten zu erzeugen wie bei einer Komplexität von 64 Amplifikaten.

Beispiel 8:

25 Verwendung von multiplen Farbstoffen zur Verifizierung der experimentellen Reproduzierbarkeit.

In dem vorliegenden Experiment werden gleiche PCR-Amplifikate mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen 30 markiert und diese in 4 facher Redundanz verifiziert. Dazu wird, ausgehend von mit Bisulfit behandelter DNA, ein definiertes Fragment der Länge 529 bp aus der Promoterregion des ELK-1 Gens mit den Primeroligonukleotiden ATGGTTTGTTAATYGTAGAGTTGTT und 35 TAAACCCRAAAAAAAACCCAATAT, amplifiziert und gegen immobilisierte Oligonukleotide, hier beispielsweise

ATTAATAGCGTTTGGTT und ATTAATAGTGTGGTT, wobei sich das nachzuweisende C bzw. T jeweils an Position 476 des Amplifikats befindet, hybridisiert. Durch Verwenden von mit Cy3, Cy5, Cy2 und Cy7 fluoreszenzmarkierten

5 Primeroligonukleotiden werden die Verhältnisse der unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Proben verglichen und auf diese Weise eine höhere experimentelle Sicherheit erzielt.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3' einer 5 genomischen DNA-Probe, dadurch gekennzeichnet, dass
 - a) man die genomische DNA chemisch behandelt, wobei man die Cytosinbasen in Uracil umwandelt, nicht aber die 5-Methylcytosinbasen;
 - b) man Teile der genomischen DNA amplifiziert, die das besagte bestimmte Cytosin enthalten, wobei die Amplifikate eine nachweisbare Markierung erhalten;
 - c) man die Amplifikate an zwei Klassen von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren mit jeweils mindestens einem Mitglied hybridisiert;
 - d) man das Ausmaß der Hybridisierung der 20 Amplifikate an die zwei Klassen von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren durch Detektion der Markierung der Amplifikate bestimmt;
 - e) man aus dem Verhältnis der an den zwei Klassen 25 von Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren in Folge der Hybridisierung detektierten Markierungen auf den Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA-Probe schließt.
- 30 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz 35 hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung

der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge.

3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende Amplifikat im wesentlichen unabhängig von dem Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.
4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass in Schritt c) eine Hybridisierung der Amplifikate an zwei Klassen von Oligomeren (Oligonukleotiden und/oder PNA-Oligomeren) mit jeweils mindestens einem Mitglied erfolgt, wobei die Oligomere der ersten Klasse bevorzugt an die Sequenz hybridisieren, welche aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA unmethyliert vorläge und weniger bevorzugt an die Sequenz, welche

aus der chemischen Behandlung der genomischen DNA hervorgeht, wenn das besagte bestimmte Cytosin in der genomischen DNA methyliert vorläge und wobei die Oligomere der zweiten Klasse an das zu untersuchende

5 Amplifikat im wesentlichen unabhängig von dem Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA hybridisieren.

- 10 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, dass man das Verfahren nicht nur mit der genomischen DNA-Probe durchführt, sondern sinngemäß auch mit bekanntermaßen an der Position des besagten bestimmten Cytosins methyliert oder aber unmethyliert vorliegender Standard-DNA, wobei die jeweils mit der unmethylierten Standard DNA gemäß Anspruch 1 gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 0 und entsprechend die jeweils mit der methylierten Standard DNA gemäß Anspruch 1 gemessenen Verhältnisse der an den beiden Klassen von Oligonukleotiden detektierten Markierungen als Eichwert für einen Methylierungsgrad von 1 dienen und man diese Eichwerte für die Bestimmung des 20 25 Methylierungsgrades der genomischen Proben-DNA einsetzt.
- 30 6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, dass man weitere bekannte Standard DNA-Proben zur Eichung verwendet, die jeweils einen beliebigen bekannten Methylierungsgrad des besagten bestimmten Cytosins aufweisen.
- 35 7. Verfahren nach einem der Ansprüche 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass die als Standard verwendeten DNAs jeweils unterschiedlich markiert sind und die

Probe (das aus einer genomischen DNA entsprechend Anspruch 1 hergestellte Amplifikat) wiederum mit einer davon verschiedenen Markierung versehen ist.

- 5 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass Amplifikate, hervorgegangen aus verschiedenen genomischen DNA-Proben, mit unterschiedlichen Markierungen versehen sind.
- 10 9. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass Amplifikate, hervorgegangen aus derselben genomischen DNA-Proben, mit unterschiedlichen Markierungen versehen sind, um über eine Mittelung der aus verschiedenen 15 Detektionsverfahren erhaltenen Werte eine Erhöhung der Messgenauigkeit zu erreichen.
- 20 10. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass besagte Markierungen Fluoreszenzmarkierungen sind.
- 25 11. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man die chemische Behandlung mit einer Lösung eines Bisulfits (=Hydrogensulfit, Disulfit) durchführt,
- 30 12. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Amplifikation Oligonukleotide verwendet werden, die einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 umfassen.
- 35 13. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass in einem

Hybridisierungsschritt Oligonukleotide und /oder Peptide Nucleic Acid (PNA) Oligomere verwendet werden, die an einen mindestens 9 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 hybridisieren oder diesem entsprechen, wobei die Basensequenz mindestens ein CpG Dinukleotid umfaßt und sich das CpG Dinukleotid in etwa im mittleren Drittel des Oligomers befindet.

10

14. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass man besagte Markierung durch ihre Chemilumineszenz, ihre UV-Absorption oder Fluoreszenzpolarisation nachweist.

15

15. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen Radionuklide sind.

20

16. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass die Markierungen ablösbare Massenmarkierungen sind, die in einem Massenspektrometer nachgewiesen werden.

25

17. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass man die PCR-Produkte insgesamt oder deren charakteristische Fragmente im Massenspektrometer nachweist und somit durch ihre Masse eindeutig charakterisiert sind.

30

18. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) einer Klasse die Sequenz 5'-CG-3' umfassen.

35

19. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) einer Klasse die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3' umfassen.
5
20. Verfahren nach den Ansprüchen 18 und 19, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere (Oligonukleotide und/oder PNA-Oligomere) der ersten Klasse die Sequenz 10 5'-CG-3' umfassen und die Oligomere der zweiten Klasse die Sequenz 5'-TG-3' und/oder die Sequenz 5'-CA-3' umfassen.
21. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, 15 dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere der ersten und der zweiten Klasse auf einer gemeinsamen Festphase immobilisiert sind.
22. Verfahren nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, 20 dass die Oligonukleotide auf einer ebenen Festphase in einem rechtwinkligen oder hexagonalen Raster angeordnet sind und der Ort bestimmter Oligonukleotide auf der Festphase mit deren jeweiliger Sequenz korreliert ist.
25
23. Verfahren nach einem der Ansprüche 1-20, dadurch gekennzeichnet, dass die Oligomere der ersten und zweiten Klasse auf Beads immobilisiert sind, welche mit einem Satz getrennt nachweisbarer Markierungen 30 codiert sind.
24. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche dadurch gekennzeichnet, dass man den Schritt b) des Anspruchs 1 in zwei Teilschritten wie folgt 35 durchführt:

5 a) eine PCR Präamplifikation mit mindestens einem Primerpaar unterschiedlicher Sequenz, die an eine nach Anspruch 1 vorbehandelte DNA-Probe unspezifisch hybridisieren und daher im PCR Schritt mehr als ein Amplifikat ergeben;

10 b) eine PCR Amplifikation des in der Präamplifikation gebildeten Produkts mit Primern unterschiedlicher Sequenz, die jeweils zu einem Abschnitt der nach Anspruch 1 vorbehandelten DNA-Probe [(+)-Strang oder (-)-Strang] identisch oder revers komplementär sind und an die zu amplifizierende DNA spezifisch hybridisieren.

15 25. Verfahren nach einem der vorangehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die Amplifikation von mehreren DNA-Abschnitten in einem Reaktionsgefäß durchführt wird.

20 26. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass für die Amplifikation eine hitzebeständige DNA-Polymerase verwendet wird.

25 27. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass die für die Amplifikation verwendeten Primeroligonukleotide der entweder nur die Basen T, A und C oder aber die Basen T, A und G enthalten.

30 28. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 10 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden.

35 29. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche, dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 50 CpG

Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden.

30. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
5 dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 100 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden.
31. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
10 dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 500 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden.
32. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
15 dadurch gekennzeichnet, dass mindestens 1000 CpG Positionen in unterschiedlichem Sequenzkontext gleichzeitig analysiert werden.
33. Verfahren nach einem der voranstehenden Ansprüche,
20 wobei die genomische DNA-Probe aus Zelllinien, Blut, Sputum, Stuhl, Urin, Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit, in Paraffin einbettetem Gewebe, beispielsweise Gewebe von Augen, Darm, Niere, Hirn, Herz, Prostata, Lunge, Brust oder Leber, histologischen Objektträgern oder
25 allen möglichen Kombinationen hiervon erhalten wurde.
34. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Diagnose und/oder Prognose nachteiliger Ereignisse für Patienten oder
30 Individuen, wobei diese nachteiligen Ereignisse mindestens einer der folgenden Kategorien angehören:
un erwünschte Arzneimittelwirkungen;
Krebserkrankungen; CNS-Fehlfunktionen, Schäden oder Krankheit; Aggressionssymptome oder
35 Verhaltensstörungen; klinische, psychologische und soziale Konsequenzen von Gehirnschädigungen;

psychotische Störungen und Persönlichkeitsstörungen; Demenz und/oder assoziierte Syndrome; kardiovaskuläre Krankheit, Fehlfunktion und Schädigung; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des gastrointestinalen Traktes; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Atmungssystems; Verletzung, Entzündung, Infektion, Immunität und/oder Rekonvaleszenz; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit des Körpers als Abweichung im Entwicklungsprozess; Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit der Haut, der Muskeln, des Bindegewebes oder der Knochen; endokrine und metabolische Fehlfunktion, Schädigung oder Krankheit; Kopfschmerzen oder sexuelle Fehlfunktion.

15 35. Verwendung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche zur Unterscheidung von Zelltypen oder Geweben oder zur Untersuchung der Zelldifferenzierung.

20 36. Kit, umfassend ein Bisulfit enthaltendes Reagenz, Primeroligonukleotiden zur Herstellung der Amplifikate und/oder vorzugsweise an einer Festphase immobilisierte Oligonukleotiden gemäß Anspruch 10 sowie eine Anleitung zur Durchführung eines Verfahrens nach einem der voranstehenden Ansprüche.

25 37. Nukleinsäure, umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer chemisch vorbehandelten DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712.

30 38. Oligomer (Oligonukleotid oder Peptide Nucleic Acid (PNA)-Oligomer) zur Detektion des Cytosin-Methylierungszustandes in chemisch vorbehandelter DNA, umfassend jeweils mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an

35

eine chemisch vorbehandelte DNA (Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712) hybridisiert.

39. Oligomer gemäß Anspruch 38, wobei die Basensequenz
5 mindestens ein CpG Dinukleotid umfaßt.

40. Oligomer gemäß Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet,
dass das Cytosin des CpG Dinukleotids in etwa im
mittleren Drittel des Oligomers befindet.

10 41. Satz von Oligomeren gemäß Anspruch 39, umfassend
mindestens ein Oligomer für zumindest eines der CpG
Dinukleotide einer der Sequenzen der Seq. ID 1 bis
Seq. ID 40712.

15 42. Satz von Oligomeren gemäß Anspruch 41, umfassend für
jedes der CpG Dinukleotide aus einer der Sequenzen
der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 mindestens ein
Oligomer.

20 43. Satz von mindestens zwei Nukleinsäuren, die als
Primeroligonukleotide zur Amplifikation gemäß
Anspruch 1 mindestens einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID
40712 oder Abschnitten davon eingesetzt werden.

25 44. Satz von Oligonukleotiden gemäß Anspruch 43, dadurch
gekennzeichnet, dass mindestens ein Oligonukleotid an
eine Festphase gebunden ist.

30 45. Satz von Oligomersonden zur Detektion des Cytosin-
Methylierungszustandes und/oder von Single Nucleotide
Polymorphismen (SNPs) in chemisch vorbehandelter
genomischer DNA gemäß einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID
40712, umfassend mindestens zehn der Oligomere gemäß
35 einem der Ansprüche 38 bis 40.

46. Verfahren zur Herstellung einer auf einem Trägermaterial fixierten Anordnung von unterschiedlichen Oligomeren (Array) zur Analyse von
5 in Zusammenhang mit dem Methylierungszustandes der CpG Dinukleotide einer der Seq. ID 1 bis Seq. ID 40712 stehenden Erkrankungen, bei dem mindestens ein Oligomer gemäß einem der Ansprüche 2 bis 4 an eine feste Phase gekoppelt wird.

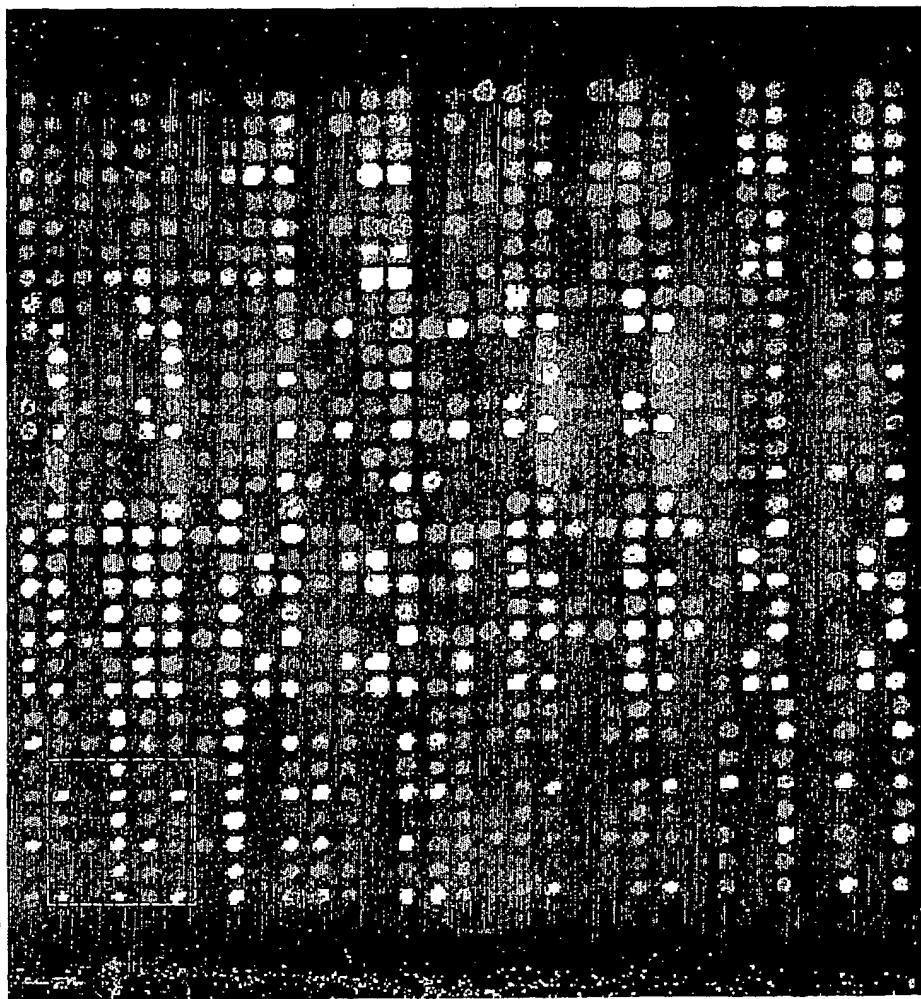
10 47. An eine Festphase gebundene Anordnung von unterschiedlichen Oligomeren (Array) nach einem der Ansprüche 38 bis 40.

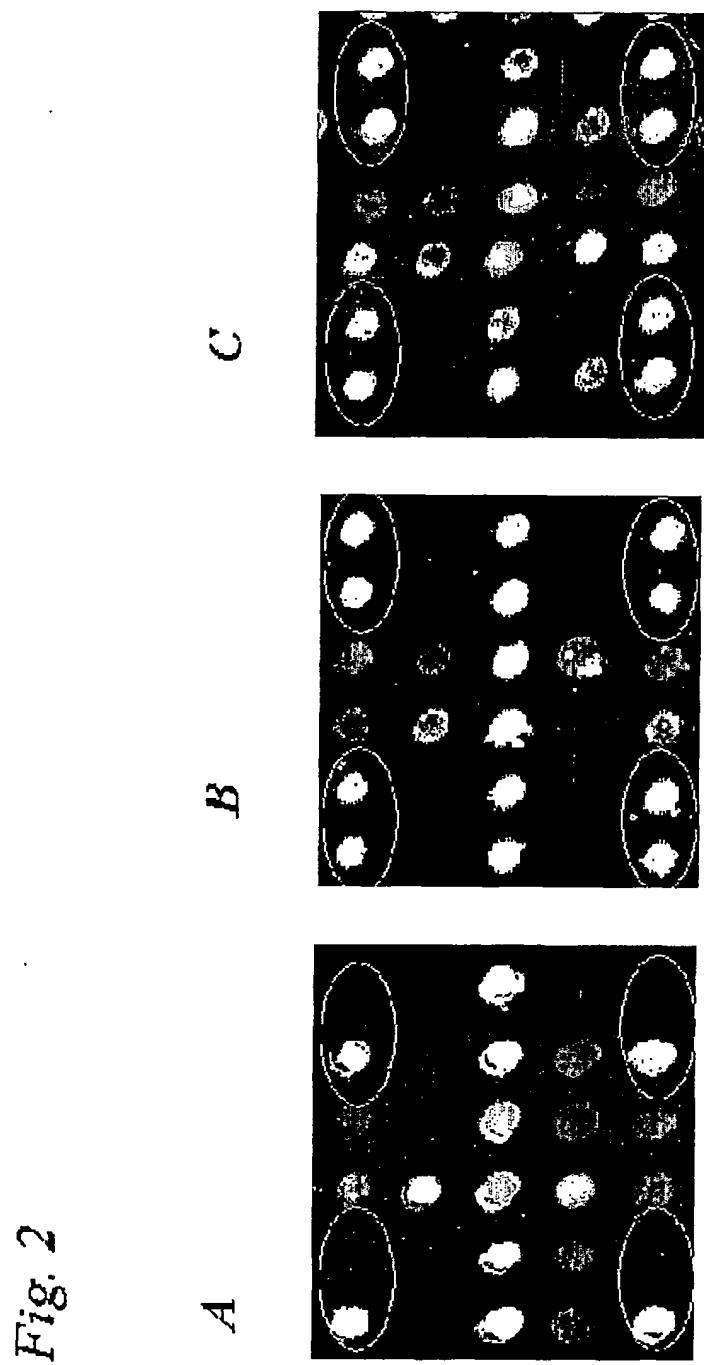
15 48. Array von unterschiedlichen Oligonukleotid- und/oder PNA-Oligomersequenzen gemäß Anspruch 47, dadurch gekennzeichnet, dass diese auf einer ebenen Festphase in Form eines rechtwinkligen oder hexagonalen Gitters angeordnet sind.

20 49. Array gemäß einem der Ansprüche 47 oder 48, dadurch gekennzeichnet, dass die Festphasenoberfläche aus Silizium, Glas, Polystyrol, Aluminium, Stahl, Eisen, Kupfer, Nickel, Silber oder Gold besteht.

25 50. DNA- und/oder PNA-Array zur Analyse von in Zusammenhang mit dem Methylierungszustand von Genen stehenden Erkrankungen, der mindestens eine Nukleinsäure gemäß einem der Ansprüche 38 bis 40 beinhaltet.

Fig. 1





(12) NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES
PATENTWESENS (PCT) VERÖFFENTLICHTE INTERNATIONALE ANMELDUNG

(19) Weltorganisation für geistiges Eigentum
Internationales Büro



(43) Internationales Veröffentlichungsdatum
7. März 2002 (07.03.2002)

PCT

(10) Internationale Veröffentlichungsnummer
WO 2002/018632 A3

(51) Internationale Patentklassifikation⁷: **C12Q 1/68**, (81) Bestimmungsstaaten (*national*): AE, AG, AL, AM, AT, G01N 33/50, B01J 19/00, C12N 15/11, A61K 31/70, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ, PH, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW.

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP2001/010074

(22) Internationales Anmelde datum:
1. September 2001 (01.09.2001)

(25) Einreichungssprache: Deutsch

(26) Veröffentlichungssprache: Deutsch

(30) Angaben zur Priorität:
100 43 826.1 1. September 2000 (01.09.2000) DE
100 44 543.8 5. September 2000 (05.09.2000) DE

(84) Bestimmungsstaaten (*regional*): ARIPO-Patent (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, TR), OAPI-Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

(71) Anmelder (*für alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme von US*): EPIGENOMICS AG [DE/DE]; Kastanienallee 24, 10435 Berlin (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (*nur für US*): OLEK, Alexander [DE/DE]; Schröderstrasse 13, 10115 Berlin (DE). PIEPENBROCK, Christian [DE/DE]; Schwartzkopffstrasse 7 B, 10115 Berlin (DE). BERLIN, Kurt [DE/DE]; Marienkäferweg 4, 14532 Stahnsdorf (DE). GÜTIG, David [DE/DE]; Kastanienallee 74, 10435 Berlin (DE).

(74) Anwalt: SCHUBERT, Klemens; Neue Promenade 5, 10178 Berlin-Mitte (DE).

(54) **Title:** METHOD FOR DETERMINING THE DEGREE OF METHYLATION OF DEFINED CYTOSINES IN GENOMIC DNA IN THE SEQUENCE CONTEXT 5'-CPG-3'

(54) **Bezeichnung:** VERFAHREN ZUR BESTIMMUNG DES METHYLIERUNGSGRADES VON BESTIMMTEM CYTOSIN IN GENOMISCHER DNA IM SEQUENZKONTEXT 5'-CPG-3'

(57) **Abstract:** The invention relates to a method for detecting the degree of methylation of a defined cytosine in the sequence context 5'-CpG-3' of a genomic DNA sample. The first stage involves chemically treating the genomic DNA in such a way that the cytosine bases, but not the 5-methylcytosine bases, are converted into uracil. Parts of the genomic DNA containing the defined cytosine are then amplified. The amplified parts are given a detectable mark and the extent of the hybridisation of the amplified parts on the two classes of oligonucleotides is then determined by detecting the mark of the amplified parts. The degree of methylation of the defined cytosine in the genomic DNA sample can be deduced on the basis of the relationship between the marks detected on the two classes of oligonucleotides following the hybridisation.

(57) **Zusammenfassung:** Beschrieben wird ein Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades eines bestimmten Cytosins im Sequenzkontext 5'-CpG-3' einer genomischen DNA-Probe. Im ersten Schritt wird die genomische DNA chemisch so behandelt, dass die Cytosinbasen in Uracil umgewandelt werden, nicht aber die 5-Methylcytosinbasen. Anschließend werden Teile der genomischen DNA amplifiziert, die das besagte bestimmte Cytosin enthalten, wobei die Amplifikate eine nachweisbare Markierung erhalten und in den folgenden Schritten wird das Ausmaß der Hybridisierung der Amplifikate an die zwei Klassen von Oligonukleotiden durch Detektion der Markierung der Amplifikate bestimmt und aus dem Verhältnis der an den zwei Klassen von Oligonukleotiden in Folge der Hybridisierung detektierten Markierungen auf den Methylierungsgrad besagten bestimmten Cytosins in der genomischen DNA-Probe geschlossen.

WO 2002/018632 A3

Veröffentlicht:

- mit internationalem Recherchenbericht
- mit dem Sequenzprotokollteil der Beschreibung in elektronischer Form getrennt veröffentlicht; auf Antrag vom Internationalen Büro erhältlich

(88) **Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts:** 5. Februar 2004

Zur Erklärung der Zwei buchstaben-Codes und der anderen Abkürzungen wird auf die Erklärungen ("Guidance Notes on Codes and Abbreviations") am Anfang jeder regulären Ausgabe der PCT-Gazette verwiesen.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Intel
bna! Application No
PCT/EP 01/10074

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER				
IPC 7	C12Q1/68	G01N33/50	B01J19/00	C12N15/11
				A61K31/70

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PAJ

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	DATABASE EMBL [Online] Human flotillin cDNA 23 September 1998 (1998-09-23), XP002230584 accession no. EMBL Database accession no. AF089750 abstract	37-39
Y	----- WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10 June 1999 (1999-06-10) the whole document	12-35, 40-50
X	----- WO 95 11995 A (AFFYMAX TECH NV ;FODOR STEPHEN P A (US); GINGERAS THOMAS R (US); L) 4 May 1995 (1995-05-04) page 21, line 23 - page 61, line 2	1-11, 36
Y	----- ----- -/-	12-35, 37-50
Y	----- WO 95 11995 A (AFFYMAX TECH NV ;FODOR STEPHEN P A (US); GINGERAS THOMAS R (US); L) 4 May 1995 (1995-05-04) page 21, line 23 - page 61, line 2	21-35, 46-50
Y	----- ----- -/-	

Further documents are listed in the continuation of box C.

Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority, claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

21 February 2003

Date of mailing of the international search report

04.11.03

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Bradbrook, D.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/EP 01/10074

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	NIEMEYER C M ET AL: "DNA MICROARRAYS**" ANGEWANDTE CHEMIE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, vol. 38, no. 19, 1999, pages 3039-3043, XP000961724 ISSN: 0044-8249 the whole document -----	21-35, 46-50
Y	REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, vol. 26, no. 10, 1998, pages 2255-2264, XP002143106 ISSN: 0305-1048 page 2258, column 2, paragraph 2 - page 2261, column 2, paragraph 1; figure 2 -----	34-50
Y	HERMAN J G ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CPG ISLANDS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, vol. 93, 1 September 1996 (1996-09-01), pages 9821-9826, XP002910406 ISSN: 0027-8424 abstract page 9822, column 1, paragraph 2 - column 2, paragraph 1 page 9823, column 1, paragraph 2 - page 9824, column 1, paragraph 2; table 1 -----	34-50
A	VOLONTE D ET AL: "Flotillin/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, vol. 274, no. 18, 30 April 1999 (1999-04-30), pages 12702-12709, XP002171909 ISSN: 0021-9258 the whole document -----	37-50
=		
=		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No. _____

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

See supplemental sheet

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

1-11, 36 (complete), 12-35, 37-50 (in part)**Remark on Protest**

The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
 No protest accompanied the payment of additional search fees.

The International Searching Authority has determined that this international application contains multiple (groups of) inventions, namely

1. Claims 1-11, 36 (in full), 12-35, 37-50 (in part)

Invention 1

nucleic acid comprising an at least 18 base long sequence section of DNA according to Seq. Id. No. 1 or 2; oligomers comprising at least one base sequence that is at least 9 nucleotides long and hybridizes to Seq. Id. No. 1 or 2; set comprising the nucleic acid or the oligomer; array comprising the oligomer and method of preparation thereof; method of detecting the degree of methylation of a genomic DNA probe; use of the oligomer or oligomer set in the method; kit for implementing the method.

2. Claims 1-11, 36 (in full), 12-35, 37-50 (in part)

Invention 2

nucleic acid comprising an at least 18 base long sequence section of DNA according to Seq. Id. No. 1 or 2; oligomers comprising at least one base sequence that is at least 9 nucleotides long and hybridizes to Seq. Id. No. 1 or 2; set comprising the nucleic acid or the oligomer; array comprising the oligomer and method of preparation thereof; method of detecting the degree of methylation of a genomic DNA probe; use of the oligomer or oligomer set in the method; kit for implementing the method.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

EP01/10074

Inventions 3-20355

...idem for Se. Id. NO. 5 & 6, 7 & 8, ...40709 & 40710.

Invention 20356

nucleic acid comprising an at least 18 base long sequence section of DNA according to Seq. Id. No. 40711 or 40712; oligomers comprising at least one base sequence that is at least 9 nucleotides long and hybridizes to Seq. Id. No. 40711 or 40712; set comprising the nucleic acid or the oligomer; array comprising the oligomer and method of preparation thereof; method of detecting the degree of methylation of a genomic DNA probe; use of the oligomer or oligomer set in the method; kit for implementing the method.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

Intel

nal Application No

PCT/EP 01/10074

Patent document cited in search report	Publication date		Patent family member(s)	Publication date
WO 9928498	A 10-06-1999		DE 19754482 A1	01-07-1999
			AT 217348 T	15-05-2002
			AU 753368 B2	17-10-2002
			AU 2408599 A	16-06-1999
			CA 2310384 A1	10-06-1999
			CN 1283235 T	07-02-2001
			WO 9928498 A2	10-06-1999
			DE 59804090 D1	13-06-2002
			DK 1034309 T3	26-08-2002
			EP 1034309 A2	13-09-2000
			ES 2173669 T3	16-10-2002
			HU 0100424 A2	28-06-2001
			JP 2001525181 T	11-12-2001
			NZ 504586 A	25-10-2002
			PL 341681 A1	23-04-2001
			PT 1034309 T	31-10-2002
			SI 1034309 T1	31-08-2002
			US 6214556 B1	10-04-2001
WO 9511995	A 04-05-1995		AU 8126694 A	22-05-1995
			EP 0730663 A1	11-09-1996
			JP 9507121 T	22-07-1997
			WO 9511995 A1	04-05-1995
			US 2003134291 A1	17-07-2003
			US 2003054393 A1	20-03-2003
			US 6632605 B1	14-10-2003
			US 2003165823 A1	04-09-2003
			US 6156501 A	05-12-2000
			US 6045996 A	04-04-2000
			US 6309823 B1	30-10-2001
			US 5861242 A	19-01-1999
			US 2003165830 A1	04-09-2003
			US 5837832 A	17-11-1998

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/10074

A. KLASIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68 G01N33/50 B01J19/00 C12N15/11 A61K31/70

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der Internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBL, WPI Data, BIOSIS, MEDLINE, EMBASE, PAJ

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^o	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	DATABASE EMBL [Online] Human flotillin cDNA 23. September 1998 (1998-09-23), XP002230584 accession no. EMBL Database accession no. AF089750	37-39
Y	Zusammenfassung -----	12-35, 40-50
X	WO 99 28498 A (OLEK ALEXANDER ;WALTER JOERN (DE); EPIGENOMICS GMBH (DE); OLEK SVE) 10. Juni 1999 (1999-06-10) das ganze Dokument	1-11,36
Y	----- WO 95 11995 A (AFFYMAX TECH NV ;FODOR STEPHEN P A (US); GINGERAS THOMAS R (US); L) 4. Mai 1995 (1995-05-04) Seite 21, Zeile 23 - Seite 61, Zeile 2 ----- -/-	12-35, 37-50
Y	----- WO 95 11995 A (AFFYMAX TECH NV ;FODOR STEPHEN P A (US); GINGERAS THOMAS R (US); L) 4. Mai 1995 (1995-05-04) Seite 21, Zeile 23 - Seite 61, Zeile 2 ----- -/-	21-35, 46-50

Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchebericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der Internationalen Recherche

Absendedatum des internationalen Rechercheberichts

21. Februar 2003

04.11.03

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Bradbrook, D.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Inte	nales Aktenzeichen
PCT/EP 01/10074	

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN		
Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	NIEMEYER C M ET AL: "DNA MICROARRAYS**" ANGEWANDTE CHEMIE, VCH VERLAGSGESELLSCHAFT, WEINHEIM, DE, Bd. 38, Nr. 19, 1999, Seiten 3039-3043, XP000961724 ISSN: 0044-8249 das ganze Dokument -----	21-35, 46-50
Y	REIN ET AL: "Identifying 5-methylcytosine and related modifications in DNA genomes" NUCLEIC ACIDS RESEARCH, OXFORD UNIVERSITY PRESS, SURREY, GB, Bd. 26, Nr. 10, 1998, Seiten 2255-2264, XP002143106 ISSN: 0305-1048 Seite 2258, Spalte 2, Absatz 2 - Seite 2261, Spalte 2, Absatz 1; Abbildung 2 -----	34-50
Y	HERMAN J G ET AL: "METHYLATION-SPECIFIC PCR: A NOVEL PCR ASSAY FOR METHYLATION STATUS OF CPG ISLANDS" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE, WASHINGTON, US, Bd. 93, 1. September 1996 (1996-09-01), Seiten 9821-9826, XP002910406 ISSN: 0027-8424 Zusammenfassung Seite 9822, Spalte 1, Absatz 2 - Spalte 2, Absatz 1 Seite 9823, Spalte 1, Absatz 2 - Seite 9824, Spalte 1, Absatz 2; Tabelle 1 -----	34-50
A	VOLONTE D ET AL: "Flotillin/cavatellins are differentially expressed in cells and tissues and form hetero-oligomeric complex with caveolins in vivo" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, AMERICAN SOCIETY OF BIOLOGICAL CHEMISTS, BALTIMORE, MD, US, Bd. 274, Nr. 18, 30. April 1999 (1999-04-30), Seiten 12702-12709, XP002171909 ISSN: 0021-9258 das ganze Dokument -----	37-50

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP 01/10074

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich

2. Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich

3. Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die Internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

siehe Zusatzblatt

1. Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.

2. Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchengebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.

3. Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.

4. Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchengebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:
1-11, 36 (komplett), 12-35, 37-50 (teilweise)

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
 Die Zahlung zusätzlicher Recherchengebühren erfolgte ohne Widerspruch.

WEITERE ANGABEN	PCT/ISA/ 210
	<p>Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, dass diese internationale Anmeldung mehrere (Gruppen von) Erfindungen enthält, nämlich:</p>
	<p>1. Ansprüche: 1-11,36 (komplett), 12-35,37-50 (teilweise)</p> <p>Erfindung 1</p> <p>Nukleinsäure umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer DNA gemäß SEQ ID N0:1 oder 2; Oligomer umfassend mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an SEQ ID N0.1 oder 2 hybridisiert; Satz umfassend die Nukleinsäure oder das Oligomer; Array umfassend das Oligomer und Herstellungsverfahren dafür; Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades einer genomischen DNA-Probe; Verwendung des Oligomers oder Oligomersatzes in dem Verfahren; Kit zur Durchführung des Verfahrens.</p> <p>---</p>
	<p>2. Ansprüche: 1-11,36 (komplett), 12-35,37-50 (teilweise)</p>

Erfindung 2

Nukleinsäure umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer DNA gemäß SEQ ID NO:3 oder 4; Oligomer umfassend mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an SEQ ID NO.1 oder 2 hybridisiert; Satz umfassend die Nukleinsäure oder das Oligomer; Array umfassend das Oligomer und Herstellungsverfahren dafür; Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades einer genomischen DNA-Probe; Verwendung des Oligomers oder Oligomersatzes in dem Verfahren; Kit zur Durchführung des Verfahrens.

Erfindungen 3-20355

...idem für SEQ ID NOS 5&6, 7&8, ..., 40709&40710.

Erfindung 20356

Nukleinsäure umfassend einen mindestens 18 Basen langen Sequenzabschnitt einer DNA gemäß SEQ ID NO:40711 oder 40712; Oligomer umfassend mindestens eine Basensequenz mit einer Länge von mindestens 9 Nukleotiden, die an SEQ ID NO.40711 oder 40712 hybridisiert; Satz umfassend die Nukleinsäure oder das Oligomer; Array umfassend das Oligomer und Herstellungsverfahren dafür; Verfahren zur Detektion des Methylierungsgrades einer genomischen DNA-Probe; Verwendung des Oligomers oder Oligomersatzes in dem Verfahren; Kit zur Durchführung des Verfahrens.

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Int	als Aktenzeichen
PCT/EP 01/10074	

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument		Datum der Veröffentlichung		Mitglied(er) der Patentfamilie		Datum der Veröffentlichung
WO 9928498	A	10-06-1999		DE 19754482 A1		01-07-1999
				AT 217348 T		15-05-2002
				AU 753368 B2		17-10-2002
				AU 2408599 A		16-06-1999
				CA 2310384 A1		10-06-1999
				CN 1283235 T		07-02-2001
				WO 9928498 A2		10-06-1999
				DE 59804090 D1		13-06-2002
				DK 1034309 T3		26-08-2002
				EP 1034309 A2		13-09-2000
				ES 2173669 T3		16-10-2002
				HU 0100424 A2		28-06-2001
				JP 2001525181 T		11-12-2001
				NZ 504586 A		25-10-2002
				PL 341681 A1		23-04-2001
				PT 1034309 T		31-10-2002
				SI 1034309 T1		31-08-2002
				US 6214556 B1		10-04-2001
<hr/>						
WO 9511995	A	04-05-1995		AU 8126694 A		22-05-1995
				EP 0730663 A1		11-09-1996
				JP 9507121 T		22-07-1997
				WO 9511995 A1		04-05-1995
				US 2003134291 A1		17-07-2003
				US 2003054393 A1		20-03-2003
				US 6632605 B1		14-10-2003
				US 2003165823 A1		04-09-2003
				US 6156501 A		05-12-2000
				US 6045996 A		04-04-2000
				US 6309823 B1		30-10-2001
				US 5861242 A		19-01-1999
				US 2003165830 A1		04-09-2003
				US 5837832 A		17-11-1998

This Page Blank (uspto)

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

This Page Blank (uspto)